Dan it-test hu maħsub purament bħala għodda ta' dokumentazzjoni u m'għandu l-ebda effett legali. L-istituzzjonijiet tal-Unjoni m'għandhom l-ebda responsabbiltà għall-kontenut tiegħu. Il-verżjonijiet awtentiċi tal-atti rilevanti, inklużi l-preamboli tagħhom, huma dawk ippubblikati fil-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea u disponibbli f'EUR-Lex. Dawk it-testi uffiċjali huma aċċessibbli direttament permezz tal-links inkorporati f'dan id-dokument

►B

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 440/2008

tat-30 ta' Mejju 2008

li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skond ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH)

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

(ĠU L 142, 31.5.2008, p. 1)

Emendat minn:

		Ġurnal Uffiċjali		
		Nru	Paġna	Data
►M1	Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 761/2009 tat-23 ta' Lulju 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 1152/2010 tat-8 ta' Diċembru 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 640/2012 tas-6 ta' Lulju 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 260/2014 tal-24 ta' Jannar 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 900/2014 tal-15 ta' Lulju 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Regolament tal-Kummissjoni (UE) 2016/266 tas-7 ta' Diċembru 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Regolament tal-Kummissjoni (UE) 2017/735 tal-14 ta' Frar 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Regolament tal-Kummissjoni (UE) 2019/1390 tal-31 ta' Lulju 2019	L 247	1	26.9.2019

Ikkoreġut minn:

►C1 Emendi, Ġ.U. L 237, 15.9.2017, p. 89 (260/2014)

▼B

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 440/2008

tat-30 ta' Mejju 2008

li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skond ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH)

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

Artikolu 1

Il-metodi ta' ttestjar li għandhom jiġu applikati għall-finijiet tar-Regolament 1907/2006/KE huma stipulati fl-Anness għal dan ir-Regolament.

Artikolu 2

Il-Kummissjoni għandha teżamina mill-ġdid, meta dan ikun f'loku, il-metodi ta' ttestjar li fih dan ir-Regolament, bil-għan li tissostitwixxi, tnaqqas jew tirfina l-ittestjar fuq l-annimali vertebrati.

Artikolu 3

Ir-referenzi kollha għall-Anness V għad-Direttiva 67/548/KEE għandhom jinftiehmu bħala referenzi għal dan ir-Regolament.

Artikolu 4

Dan ir-Regolament għandu jidħol fis-seħħ fl-għoxrin jum wara dak tal-pubblikazzjoni tiegħu fil-*Ġurnal Uffiċjali ta' l-Unjoni Ewropea*.

Għandu japplika mill-1 ta' Ġunju 2008.

▼B

ANNESS

PARTI A: METODI GĦAD-DETERMINAZZJONI TAL-PROPRJETAJIET FIŻIKO-KIMIĊI

▼M6

Nota:

Qabel ma jintuża xi wieħed mill-metodi ta' ttestjar li ġejjin biex tiġi ttestjata sustanza multikostitwenti (MCS), sustanza ta' kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, proditt ta' reazzjoni kumplessa jew materjal bijoloġiku (UVCB), jew taħlita u fejn l-applikabbiltà tiegħu għall-ittestjar ta' MCS, UVCB jew taħlitiet ma tkunx indikata fil-medtodu tal-ittestjar rispettiv, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-metodu huwiex xieraq għall-finijiet regolatorji maħsuba.

Jekk il-metodu ta' ttestjar jintuża għall-ittestjar ta' MCS, UVCB jew taħlita, għandha titqiegħed kemm jista' jkun disponibbli biżżejjed informazzjoni dwar il-kompożizzjoni tagħha, eż. mill-identità kimika tal-kostitwenti tagħha, l-okkorrenza kwantitattiva tagħhom, u l-proprjetajiet rilevanti tal-kostitwenti tagħha.

▼B

WERREJ

A.1. TEMPERATURA TA' TIDWIB/IFFRIŻAR

A.2. TEMPERATURA TAT-TGĦOLIJA

A.3 DENSITÀ RELATTIVA

A.4. PRESSJONI TA' FWAR

A.5. TENSJONI TAS-SUPERFIĊJE

A.6. SOLUBILITÀ FL-ILMA

A.8. KOEFFIĊJENT TAL-QSIM

A.9. IL-PUNT TA' fjammabilità

A.10. FJAMMABILITÀ (SOLIDI)

A.11. FJAMMABILITÀ (GASSIJIET)

A.12. FJAMMABILITÀ (KUNTATT MA' L-ILMA)

A.13. PROPRJETAJIET PIROFORIĊI TA' SOLIDI U LIKWIDI

A.14. PROPRJETAJIET ESPLOŻIVI

A.15. TEMPERATURA TA' AWTO-FJAMMABILITÀ -(LIKWIDI U GASSIJIET)

A.16. TEMPERATURA TA' AWTO-FJAMMABILITÀ RELATTIVA GĦAL SOLIDI

A.17. PROPRJETAJIET OSSIDANTI (SOLIDI)

A.18. IL-MEDJA TAL-PIŻ MOLEKULARI TAN-NUMRU U D-DISTRIBUZZJONI TAL-PIŻ MOLEKULARI TAL-POLIMERI

A.19. KONTENUT TA' POLIMERI TA' PIŻ MOLEKULARI BAXX

A.20. L-IMĠIBA TAS-SOLUZZJONI/TA' L-ESTRAZZJONI TA' POLIMERI FL-ILMA

A.21. PROPRJETAJIET OSSIDIZZANTI (LIKWIDI)

A.22. ID-DIJAMETRU MEDJU ĠEOMETRIKU TAL-FIBRI PEŻAT SKONT IT-TUL TAGĦHOM

A.23. KOEFFIĊJENT TAL-PARTIZZJONI (1-Ottanol/Ilma): METODU TA' TĦAWWID BIL-MOD

A.24. KOEFFIĊJENT TA' PARTIZZJONI (N-OTTANOL/ILMA), METODU TA' KROMATOGRAFIJA LIKWIDA BI PRESTAZZJONI GĦOLJA (HPLC)

A.25. KOSTANTI TA' DISSOĊJAZZJONI FL-ILMA (METODU TA' WINKLER — METODU SPETTROFOTOMETRIKU — METODU KONDUTTOMETRIKU)

▼B

A.1. **TEMPERATURA TA' TIDWIB/IFFRIŻAR**

1. **METODU**

Il-maġġoranza tal-metodi mfissra huma bbażati fuq il-linja gwida ta' l-OECD Test (1). Il-prinċipji fundamentali huma mogħtija fir-referenzi (2) u (3).

1.1. DAĦLA

Il-metodi u l-apparati mfissra għandhom ikunu applikati għad-determinazzjoni tat-temperatura ta' tidwib ta' sustanzi, minghajr ebda restrizzjoni fir-rigward tal-grad ta' purità tagħhom.

L-għażla tal-metodu hija dipendenti fuq in-natura tas-sustanza li se tiġi ttestjata. Bħala konsegwenza l-fattur ta' limitazzjoni jkun skond, jekk is-sustanza tistax tiġi mfarrka malajr jew le, b'diffikultà, jew xejn affattu.

Għal xi sustanzi, id-determinazzjoni tat-temperatura ta' l-iffriżar jew solidifikazzjoni hija aktar xierqa u l-istandards għal dawn id-determinazzjonijiet ġew inklużi wkoll f'dan il-metodu.

Fejn, minħabba il-proprjetajiet partikulari tas-sustanza, ebda wieħed mill-parametri t'hawn fuq ma jista' jkun mkejjel b'mod konvenjenti, punt ta' tferriegħ jista' jkun xieraq.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

It-temperatura tat-tidwib hija mfissra bħala t-temperatura li fiha t-transizzjoni f'faži minn stat solidu għal dak likwidu ssir fi pressjoni atmosferika u din it-temperatura tikkorrispondi idealment mat-temperatura ta' l-iffriżar.

Peress li t-transizzjoni f'faži ta' bosta sustanzi titwettaq fuq skala ta' temperatura, ta' spiss hija mfissra bħala l-iskala tat-tidwib.

Konverżjoni ta' unitajiet (K għal ^{o}C)

$t = T - 273,15$

t: Temperatura Celsius, grad Celsius (^{o}C)

T: temperatura termodinamika, kelvin (K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza mhumiex meħtieġa li jintużaw fil-każijiet kollha meta tkun qed tiġi investigata sustanza ġdida. Huma għandhom iservu primarjament biex jiċċekkjaw ir-rendiment tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu tqabbil ma' riżultati minn metodi oħra.

Xi sustanzi ta' kalibrazzjoni huma mniżżla fir-referenzi (4).

▼B

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

It-temperatura (l-iskala tat-temperatura) tat-transizzjoni f'faża mill-istat solidu għal dak likwidu jew mill-istat likwidu għal dak solidu hija determinata. Fil-prattika waqt it-tisħin/tkessiħ ta' kampjun tas-sustanza għall-ittestjar fi pressjoni atmosferika t-temperaturi ta' tidwib/iffriżar inizjali u l-istadju finali tat-tidwib/iffriżar jiġu determinati. Ħames tipi ta' metodi huma mfissra, jiġifieri metodu kapillari, metodi ta' uċuh ta'sħana, determinazzjonijiet ta' temperatura ta' ffriżar, metodi ta' analiżi termika, u determinazzjoni ta' punt ta' tferriegħ (kif żviluppat għaż-żjut tal-pitrolju).

F'ċerti każijiet, jista' jkun konvenjenti li titkejjel it-temperatura ta' l-iffriżar flok it-temperatura ta' tidwib.

1.4.1. **Metodu kapillari**

1.4.1.1. *Apparati li jiffissaw it-temperatura tat- tidwib b'banju ta' likwidu*

Ammont żgħir tas-sustanza mfarrka sewwa jitpoġġa f'tubu kapillari u jiġi ppakkjat sewwa. It-tubu jissaħħan, flimkien ma' termometru, u żżieda fit-temperatura tiġi aġġustata għal inqas minn madwar l K/min matul it-tidwib innifsu. It-temperaturi tat-tidwib inizjali u finali jiġu determinati.

1.4.1.2. *Apparati li jiffissaw it-temperatura tat-tidwib bi blokka tal-metall*

Kif imfisser taħt 1.4.1.1., ħlief li t-tubu kapillari u t-termometru jitpoġġew fi blokka msaħħna tal-metall, u jistgħu jkunu osservati minn ġo toqob fil-blokka.

1.4.1.3. *Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula*

Il-kampjun fit-tubu kapillari huwa msaħħan awtomatikament f'ċilindru tal-metall. Raġġ ta' dawl huwa dirett minn ġos-sustanza, permezz ta' toqba fiċ-ċilindru, sa fotoċellula kalibrata b'mod preċiż. Il-proprjetajiet ottiċi ta' ħafna sustanzi jinbidlu minn opak għal trasparenti meta jkunu qed jiddewbu. L-intensità tad-dawl li tilħaq lill-fotoċellula tiżdied u tibgħat sinjal ta' waqfien lill-indikatur diġitali li jkun qed jaqra t-temperatura tat-termometru ta' reżistenza tal-platinu li jkun jinsab fil-kompartiment tat-tisħin. Dan il-metodu mhuwiex adattat għal xi sustanzi b'kuluri qawwija.

1.4.2. **Uċuh ta' Sħana**

1.4.2.1. *Il-bank sħun Kofler*

Il-bank sħun Kofler juża biċċtejn tal-metall ta' konduttività termika differenti, imsaħħna b'mod elettriku, bil-bank iddisinjat sabiex il-gradjent tat-temperatura huwa kwazi lineari matul it-tul tiegħu. It-temperatura tal-bank sħun tista' tinfirex minn 283 sa 573 K b'apparat speċjali li jaqra t-temperatura li jinkludi *runner* b'indiċi u marka ta' identifikazzjoni maħsubin għall-bank speċifiku. Bil-għan li tkun determinata temperatura tat-tidwib, is-sustanza titqiegħed, f'saff irqiq, direttament fuq il-wiċċ tal-bank sħun. Fi ftit sekondi tiżviluppa linja ta' separazzjoni netta bejn il-faża fluwida u dik solida. It-temperatura fil-linja ta' separazzjoni tinqara bl-aġġustament ta' l-indiċi mal-bqija tal-linja.

▼B

1.4.2.2. *Mikroskopju tat-tidwib*

Bosta uċuh sħan tal-mikroskopju jintużaw għad-determinazzjoni tat-temperaturi tat-tidwib bi kwantitajiet żgħar ferm ta' materjal. F'ħafna minn dawn l-uċuh sħan it-temperatura titkejjel b'termokoppja sensittiva iżda xi drabi jintużaw termometri tal-merkurju. Apparat tipiku għad-determinazzjoni tal-punt tat-tidwib fi stadju sħun għandu kompartiment ta' sħana li fiha pjanċa metallika li fuqha jitqiegħed il-kampjun fuq *slide*. Iċ-ċentru tal-pjanċa metallika għandu toqba li tippermetti d-dħul tad-dawl mill-mera illuminanti tal-mikroskopju. Meta tkun qed tintuża, il-kompartiment tingħalaq bi pjanċa tal-ħġieġ biex teskludi l-arja miż-żona tal-kampjun.

It-tisħin tal-kampjun huwa regolat minn reostat. Għal kejl preċiż ħafna fuq sustanzi ottikament anisotropiċi, jista' jintuża dawl polarizzat.

1.4.2.3. *Metodu tal-menisku*

Dan il-metodu jintuża b'mod speċifiku għal poliamidi

It-temperatura li fiha l-ispostament tal-menisku taż-żejt tas-silikone, maqbud bejn il-wiċċ sħun u għatu tal-ħġieġ sostnut mill-kampjun tal-poliamide li jkun qed jigi ttestjat.

1.4.3. **Metodu biex tkun determinata t-temperatura ta' l-iffriżar**

Il-kampjun jitpoġġa f'tubu tat-testijiet speċjali u jitpoġġa f'apparat għad-determinazzjoni tat-temperatura ta' l-iffriżar. Il-kampjun jiġi mħawwad b'ġentilezza u kontinwament matul it-tkessiħ u t-temperatura tiġi mkejla f'intervalli adattati. Hekk kif it-temperatura tibqa' kostanti għal qari din it-temperatura (korretta għall-iżball tat-termometru) tiġi reġistrata bħala t-temperatura ta' l-iffriżar.

Għandu jkun evitat is-*supercooling* billi jinżamm l-ekwilibriju bejn il-fażijiet solidi u likwidi.

1.4.4. **Analiżi termika**

1.4.4.1 *Analiżi termika differenzjali (ATD)*

Din it-teknika tirreġistra d-differenza fit-temperaturi bejn is-sustanza u l-materjal ta' referenza bħala funzjoni tat-temperatura, waqt li s-sustanza u l-materjal ta' referenza huma suġġetti għall-istess programm ta' temperatura kontrollata. Meta l-kampjun jgħaddi minn transizzjoni li tinvolvi bidla ta' entalpija, dik il-bidla hija indikata b'devjazzjoni endotermika (tidwib) jew eżotermika (iffriżar) mil-linja tal-bażi tar-reġistru tat-temperatura.

▼B

1.4.4.2 *Kalorimetrija differenzjali ta'l-iskennjar (KDS)*

Din it-teknika tirreġistra d-differenza fl-enerġija introdotta f'sustanza u dik introdotta f'materjal ta' referenza, bħala funzjoni tat-temperatura, waqt li s-sustanza u l-materjal ta' referenza huma suġġetti għall-istess programm ta' temperatura kontrollata. Din l-enerġija hija l-enerġija meħtieġa biex tinżamm żero d-differenza tat-temperatura bejn is-sustanza u l-materjal ta' referenza. Meta l-kampjun jgħaddi minn transizzjoni li tinvolvi bidla ta' entalpija, dik il-bidla hija indikata b'devjazzjoni endotermika (tidwib) jew eżotermika (iffriżar) mil-linja ta' bażi tar-reġistru tal-fluss tas-sħana.

1.4.5. **Punt ta' tferriegħ**

Dan il-metodu kien żviluppat biex jintużaw maż-żjut tal-pitrolju u huwa adattat għal użu ma' sustanzi żejtnin b'temperaturi baxxi ta' l-iffriżar.

Wara tisħin preliminari, il-kampjun jitkessaħ b'rata speċifika u eżaminat f'intervalli ta' 3 K għall-karatteristiċi tat-tferriegħ. L-inqas temperatura li fiha jiġi osservat moviment tas-sustanza tiġi reġistrata bħala l-punt ta' tferrigħ.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

L-applikabilità u l-eżattezza tal-metodi differenti użati għad-determinazzjoni tat-temperatura tat-tidwib/skala tat-tidwib huma mniżżla fit-tabella li ġejja:

TABELLA: APPLIKABILITÀ TAL-METODI

A. **Metodi kapillari**

Metodu ta' kejl	Sustanzi li jistgħu jitfarrku	Sustanzi li ma jintaħnux malajr	Skala ta' temperatura	Kalkolu ta' l-eżattezza ([1])	Standards eżistenti
Apparati li jiffissaw it-temperatura ta' tidwib b'banju ta' likwidu	iva	għal ftit biss	273 sa 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Apparati li jiffissaw it-temperatura ta' tidwib bi blokka tal-metall	iva	għal ftit biss	293 sa >573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula	iva	Bosta b'apparati ta' tagħmir	253 sa 573 K	± 0,5 K	

([1]) Dipendenti fuq it-tip ta' strument u fuq il-grad ta' purità tas-sustanza

▼B

B. **Uċuh sħan u metodi ta' ffriżar**

Metodu ta' kejl	Sustanzi li jistgħu jitfarrku	Sustanzi li ma jitfarrkux malajr	Skala ta' temperatura	Kalkolu ta' l-eżattezza (1)	Standards eżistenti
Il-bank sħun Kofler	iva	le	283 sa >573 K	± 1K	ANSI/ASTM D 3451-76
Mikroskopju tat-tidwib	iva	għal ftit biss	273 sa >573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Metodu tal-menisku	le	Speċifikament għal poliamidi	293 sa >573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Temperatura ta' l-iffriżar	iva	iva	223 sa 573 K	± 0,5 K	eż. BS 4695

(1) Dipendenti fuq it-tip ta' strument u fuq il-grad ta' purità tas-sustanza.

C. **Analiżi termika**

Metodu ta' kejl	Sustanzi li jistgħu jitfarrku	Sustanzi li ma jitfarrkux malajr	Skala ta' temperatura	Kalkolu ta' l-eżattezza (1)	Standards eżistenti
Analiżi termika differenzjali	iva	Iva	173 sa 1 273 K	sa 600 K ± 0,5 K sa 1 273 K ± 2,0K	ASTM E 537-76
Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar	iva	iva	173 sa 1 273 K	sa 600 K ± 0,5 K sa 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Dipendenti fuq it-tip ta' strument u fuq il-grad ta' purità tas-sustanza.

D. **Punt ta' tferrigħ**

Metodu ta' kejl	Sustanzi li jistgħu jitfarrku	Sustanzi li ma jitfarrkux malajr	Skala ta' temperatura	Kalkolu ta' l-eżattezza (1)	Standards eżistenti
Punt ta' tferrigħ	għal żjut tal-pitrolju u sustanzi żejtnin	għal żjut tal-pitrolju u sustanzi żejtnin	223 sa 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) Dipendenti fuq it-tip ta' strument u fuq il-grad ta' purità tas-sustanza.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

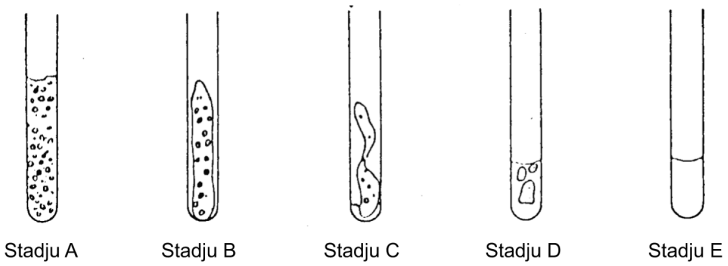
Il-proċeduri għal kważi l-metodi ta' ttestjar kollha tfissru fi standards internazzjonali u nazzjonali (Ara Appendiċi 1)

1.6.1. **Metodi permezz ta' tubu kapillari**

Meta jkunu suġġetti għal żieda bil-mod tat-temperatura, sustanzi mfarrka f'mod fin is-soltu juru l-istadji ta' tidwib murija fil-figura 1.

▼B

Figura 1



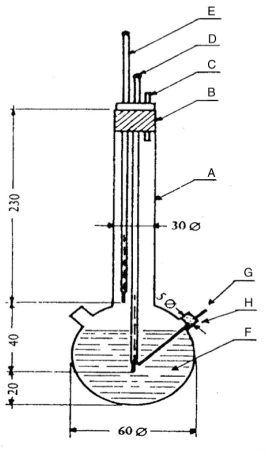
Stadju A	(Bidu tat-tidwib): Qtar żgħar jeħlu b'mod uniformi ma' ġewwa tat-tubu kapillari
Stadju B	jidher spazju vojt bejn il-kampjun u l-ġewwa tat-tubu minħabba li t-tidwiba tiċkien
Stadju C	il-kampjun mċekken jibda jikkollassa 'l isfel u jillikwifa ruħu
Stadju D	menisku komplet jiġi ffurmat fil-wiċċ iżda ammont apprezzabbli tal-kampjun jibqa' solidu
Stadju E	(Fl-istadju finali tat-tidwib): ma hemm ebda partikuli solidi

Matul id-determinazzjoni tat-temperatura tat-tidwib, it-temperaturi jiġu reġistrati fil-bidu ta' l-istadju tat-tidwib u b'dak finali.

1.6.1.1. *Tagħmir li jiffissa t-temperatura ta' tidwib b'apparat ta' banju ta' likwidu*

Il-Figura 2 turi tip ta' apparat standardizzat tat-temperatura ta' tidwib magħmul mill-ħġieġ (JIS K 0064); l-ispeċifikazzjonijiet kollha huma b'millimetri.

Figura 2



A:Reċipjent tal-kejl
B:Tapp
C:Fetħa
D:Termometru
E:Termometru awżiljarju
F:Banju ta' likwidu
G:Tubu kapillari magħmul mill-ħġieġ, minn 80 sa 100 mm fit-tul 1,0 ± 0,2 mm dijametru intern, minn 0,2 sa 0,3 mm ħxuna tas-superfiċje tat-tubu
H:Tubu tal-ġenb

▼B

Banju ta' likwidu:

Għandu jingħażel likwidu adattat. L-għażla tal-likwidu tiddependi fuq it-temperatura tat-tidwib li għandha tiġi determinata, eż. paraffin likwidu għal temperaturi tad-tidwib mhux ogħla minn 473 K, żejt tas-silikone għal temperaturi tat-tidwib mhux ogħla minn 573 K

Għal temperaturi tat-tidwib fuq il-523 K, tista' tintuża taħlita li tikkonsisti minn tliet partijiet aċidu sulfuriku u żewġ partijiet sulfat tal-potassju (fi proporzjon tal-piż). Għandhom jittieħdu prekawzjonijiet xierqa jekk tintuża taħlita bħal din.

Termometru:

Għandhom jintużaw biss dawk it-termometri li jissodisfaw ir-rekwiżiti ta' l-istandards li ġejjin jew l-ekwivalenti tagħhom:

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

Proċedura:

Is-sustanza niexfa titfarrak b'mod fin ħafna fi trab u titpoġġa f'tubu kapillari, magħluq f'tarf minnhom, bil-għan li l-livell tal-mili jkun approssimattivament 3 mm wara li jkun ippakkjat sewwa. Biex jinkiseb kampjun ippakkjat uniformi, it-tubu kapillari għandha jitwaqqa' minn għoli approssimattiv ta' 700 mm minn tubu tal-ħġieġ b'mod vertikali fuq *watchg*.

It-tubu kapillari mimli jitpoġġa fil-banju sabiex il-parti tan-nofs tal-bozza tal-merkurju tat-termometru tmiss it-tubu kapillari fil-parti fejn hemm il-kampjun. Is-soltu t-tubu kapillari jiġi introdott fl-apparat madwar 10 K taħt it-temperatura tat-tidwib.

Il-banju ta' likwidu jissaħħan sabiex it-temperatura ogħla sa approssimattivament 3 K/min. Il-likwidu għandu jitħawwad. F'madwar 10 K taħt it-temperatura tat-tidwib mistennija r-rata taż-żieda fit-temperatura tiġi aġġustata għal massimu ta' 1 K/min.

Kalkolu:

Il-kalkolu tat-temperatura tat-tidwib hija kif ġej:

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

fejn:

T = it-temperatura tat-tidwib korretta f'K

T_D = qari tat-temperatura mit-termometru D f'K

T_E = qari tat-temperatura mit-termometru E f'K

n = numru ta' gradazzjonijiet tal-ħajta tal-merkurju fuq termometru D fil-parti li qiegħda fil-wiċċ ta' l-ilma

1.6.1.2 *Apparati li jiffissaw it-temperatura ta' tidwib bi blokka tal-metall*

Apparat:

Dan jikkonsist fi:

— blokka ċilindrika tal-metall, li l-parti ta' fuq tagħha hija konkava u tifforma kompartiment (ara figura 3),

— tapp tal-metall, b'żewġ toqob jew aktar, li jippermetti li tubi jiġu mmuntati fil-blokka tal-metall,

▼B

— sistema ta' tisħin, għall-blokka tal-metall, provduta, eż., minn reżistenza elettrika inkorporata fil-blokka,

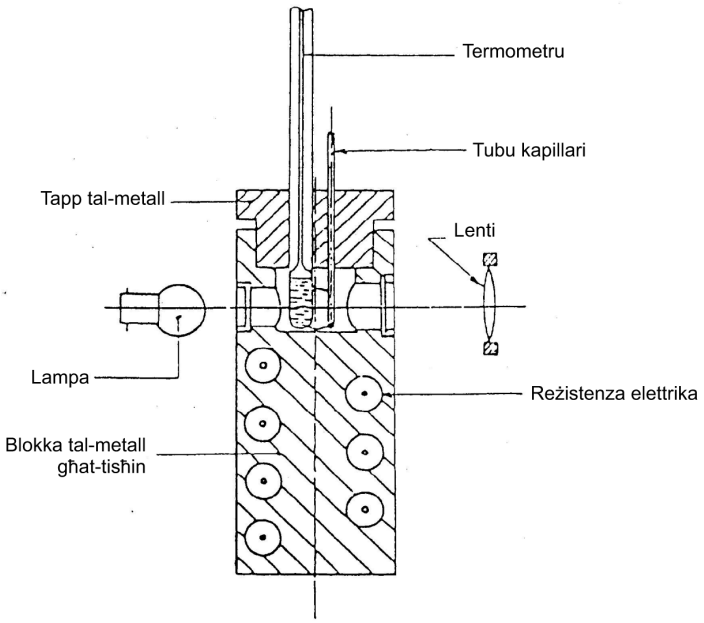
— reostat għar-regolazzjoni tal-qawwa applikata, jekk jintuża tisħin elettriku.

— erba' twieqi ta' ħġieġ li jiflaħ għas-sħana fuq il-ġnub laterali tal-kompartiment, imqiegħda dijametrikalment f'anglu rett ma' xulxin. Quddiem waħda minnhom tkun immuntata lenti għall-osservazzjoni tat-tubu kapillari. It-tliet twieqi l-oħra jintużaw biex jinxteħel l-intern permezz ta' lampi,

— tubu kapillari ta' ħġieġ li jirreżisti s-sħana magħluq minn naħa waħda (ara 1.6.1.1).

Ara l-istandards imsemmija f' 1.6.1.1. Jistgħu jintużaw ukoll apparati tal-kejl termoelettriċi b'eżattezza komparabbli.

Figura 3



1.6.1.3. *Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula*

Apparat u proċedura:

L-apparat jikkonsisti f' kompartiment tal-metall b'sistema awtomatizzata ta' tisħin. Tliet kapillari jimtlew skond il-1.6.1.1. u jitpoġġew fil-forn.

▼B

Huma disponibbli bosta żidiet lineari biex ikun kalibrat l-apparat u żżieda adattata fit-temperatura hija aġġustata bl-elettriku b'rata kostanti u lineari magħżula minn qabel. Reġistri juru t-temperatura attwali fil-forn u t-temperatura tas-sustanza fit-tubi kapillari.

1.6.2. **Uċuh sħan**

1.6.2.1. *Il-bank sħun Kofler*

Ara l-Appendiċi

1.6.2.2. *Mikroskopju tat-tidwib*

Ara l-Appendiċi

1.6.2.3. *Metodu tal-menisku (poliamidi)*

Ara l-Appendiċi

Ir-rata tat-tisħin mit-temperatura tat-tidwib għandha tkun inqas minn 1 K/min.

1.6.3. **Metodi għad-determinazzjoni tat-temperatura ta' l-iffriżar**

Ara l-Appendiċi

1.6.4. **Analiżi termika**

1.6.4.1. *Analiżi termika differenzjali*

Ara l-Appendiċi

1.6.4.2. *Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar*

Ara l-Appendiċi

1.6.5. **Determinazzjoni tal-punt tat-tferrigħ**

Ara l-Appendiċi

2. **DATA**

Korrezzjoni tat-termometru hija neċessarja f' xi każijiet.

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— metodu użat

— speċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet) u l-pass preliminari ta' purifikazzjoni, jekk ikun hemm,

— kalkolu ta' l-eżattezza

Il-medja talanqas żewġ kejlijiet li huma fl-iskala ta' l-eżattezza kalkulata (ara t-tabelli) hija reġistrata bħala t-temperatura tat-tidwib.

▼B

Jekk id-differenza bejn it-temperatura fil-bidu u fl-istadju finali tat-tidwib hija fil-limiti ta' l-eżattezza tal-metodu, it-temperatura fl-istadju finali tat-tidwib titqiegħed bħala t-temperatura tat-tidwib; inkella ż-żewġ temperaturi għandhom ikunu rapportati.

Jekk is-sustanza tiddekomponi jew tissaffa bis-sublimazzjoni qabel ma tintlaħaq it-temperatura, it-temperatura li fiha jiġi osservat l-effett għandha tkun rapportata.

L-informazzjoni u r-rimarki kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rapportati, b'mod speċjali fir-rigward ta' l-impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

4. **REFERENZI**

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

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

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

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

▼B

Appendiċi

Għal dettalji tekniċi addizzjonali, l-istandards li ġejjin jistgħu jkunu kkonsultati bħala eżempju.

1. **Metodi kapillari**

1.1. Apparati li jiffissaw it-temperatura ta' tidwib b'banju ta' likwidu

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

1.2 Apparati li jiffissaw it-temperatura ta' tidwib bi blokka tal-metall

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelz-temperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics- polyamides -determination of “melting point”

2. **Elementi Imsaħħnin**

2.1. Il-bank sħun Kofler

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

2.2. Mikroskopju tat-tidwib

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelz-temperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Metodu tal-menisku (poliamidi)

ISO 1218 (E)	Plastics -poly ami des -determination of “melting point”

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Resines de polyamides. Determination du “point de fusion” methode du menisque

3. **Metodi għad-determinazzjoni tat-temperatura ta' l-iffriżar**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de petrole: determination de la temperature de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiiuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Methode de determination du point de cristallisation (point de Congelation
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Analiżi termika**

4.1. Analiżi termika differenzjali

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

▼B

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

4.2. Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar

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

5. **Determinazzjoni tal-punt tat-tferriegħ**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'ecoulement limite -Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils –Determination of pour point

▼B

A.2. TEMPERATURA TAT-TGĦOLIJA

1. METODU

Il-maġġoranza tal-metodi mfissra huma bbażati fuq il-linjagwida tat-Test OECD (1). Il-prinċipji fundamentali huma mogħtija fir-referenzi (2) u (3).

1.1. DAĦLA

Il-metodi u l-apparati mfissra hawnhekk jistgħu jiġu applikati għal likwidu u għal sustanzi li jiddewbu bil-mod f' temperatura baxxa, bil-kondizzjoni li dawn ma jkollhomx xi reazzjoni kimika taħt it-temperatura tat-tgħolija (eż.: awto-ossidazzjoni, traspożizzjoni, degradazzjoni, eċċ.). Il-metodi jistgħu jiġu applikati għal sustanzi likwidi puri u impuri.

Issir enfasi fuq il-metodi li jużaw osservazzjoni permezz ta' fotoċellula u analiżi termika, għaliex dawn il-metodi jippermettu d-determinazzjoni tat-temperaturi tat-tidwib kif ukoll dawk tat-tgħolija. Barra dan, il-kejlijiet jistgħu jsiru b'mod awtomatiku.

Il-"metodu dinamiku" għandu l-vantaġġ li jista' jiġi applikat ukoll għad-determinazzjoni tal-pressjoni tal-fwar u mhuwiex neċessarju li t-temperatura tat-tgħolija tkun korretta sal-pressjoni normali (101,325 kPa) għaliex il-pressjoni normali tista' tiġi aġġustata matul il-kejl minn manostat.

Rimarki:

L-influwenza ta' impuritajiet fuq id-determinazzjoni tat-temperatura tat-tgħolija tiddependi l-aktar fuq in-natura ta' l-impurità. Meta fil-kampjun ikun hemm impuritajiet volatili, li jistgħu jaffetwaw ir-riżultati, is-sustanza tista' tiġi ppurifikata.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

It-temperatura normali tat-tgħolija hija mfissra bħala t-temperatura li fiha l-pressjoni tal-fwar tal-likwidu hija 101,325 kPa.

Jekk it-temperatura tat-tgħolija ma titkejjilx fi pressjoni atmosferika normali, id-dependenza tat-temperatura fuq il-pressjoni tal-fwar tista' tiġi deskritta bl-ekwazzjoni Clausius-Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + const.$$

fejn:

P = il-pressjoni tal-fwar tas-sustanza f' pascals

ΔH_v = is-sħana ta' evaporizzazzjoni tiegħu f' J mol^{-1}

R = il-kostanti universali molari tal-gass = 8,314 mol^{-1} K^{-1}

T = it-temperatura termodinamika, f' K

It-temperatura tat-tgħolija hija murija skond il-pressjoni ta' l-ambjent matul il-kejl.

▼B

Bdil

Pressjoni (unitajiet: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(“bar” għadha permessa iżda mhux rakkomandata)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(l-unitajiet “mm Hg” u “Tor” mhumiex permessi).

1 atm = atmosfera standard = 101 325 Pa

(l-unità “atm” mhix permessa).

Temperatura (unitajiet: K)

t = T - 273,15 K

t: temperatura Celsius, grad Celsius (^{o}C)

T: temperatura termodinamika, kelvin (K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

M'hemmx bżonn li jintużaw sustanzi ta' referenza fil-każijietjiet kollha kull meta tkun qed tiġi investigata sustanza ġdida. Huma primarjament qegħdin biex ikun iċċekkjat ir-rendiment tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu paragun ma' riżultati minn metodi oħra.

Xi sustanzi ta' kalibrazzjoni jinsabu fil-metodi elenkati fl-Appendiċi.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-ITTESTJAR

Ħames metodi għad-determinazzjoni tat-temperatura tat-tgħolija (skala tat-temperatura tat-tgħolija) huma bbażati fuq il-kejl tat-temperatura tat-tgħolija, tnejn oħra huma bbażati fuq analiżi termika.

1.4.1. **Determinazzjoni bl-użu ta' l-ebulliometer**

L-ebulliometers kienu żviluppati oriġinarjament għad-determinazzjoni tal-piż molekulari permezz taż-żieda fit-temperatura tat-tgħolija, iżda huma adattati wkoll għal kejl eżatt tat-temperatura tat-tgħolija. Apparat sempliċi ħafna huwa mfisser fl-ASTM D 1120-72 (ara l-Appendiċi). Il-likwidu jissaħħan f' dan l-apparat taħt kondizzjonijiet ta' ekwilibriju fi pressjoni atmosferika sakemm jiftaħ jagħli.

1.4.2. **Metodu dinamiku**

Dan il-metodu jinvolvi il-kejl tat-temperatura tar-rikondensazzjoni tal-fwar permezz ta' termometru adattat fir-rifluss waqt it-tgħolija. B'dan il-metodu l-pressjoni tista' tiġi varjata.

1.4.3. **Metodu ta' distillazzjoni għat-temperatura tat-tgħolija**

Dan il-metodu jinvolvi d-distillazzjoni tal-likwidu u l-kejl tat-temperatura tar-rikondensazzjoni tal-fwar u d-determinazzjoni ta' l-ammont ta' l-iddistillat.

▼B

1.4.4. **Metodu skond Siwoloboff**

Kampjun jissaħħan f' tubu għall-kampjun, li jkun mgħaddas f' likwidu ġo banju sħun. Kapillari mgħaqqda, li fiha bużżieqa ta' l-arja fil-parti t'isfel, tiġi mgħaddsa fit-tubu bil-kampjun.

1.4.5. **Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula**

Skond il-prinċipju Siwoloboff, kejl foto-elettriku awtomatiku jsir bit-tlugħ tal-bżieżaq.

1.4.6. **Analiżi termika differenzjali**

Din it-teknika tirreġistra d-differenza fit-temperaturi bejn is-sustanza u l-materjal ta' referenza bħala funzjoni tat-temperatura, waqt li s-sustanza u l-materjal ta' referenza huma suġġetti għall-istess programm kontrollat ta' temperatura. Meta l-kampjun jgħaddi minn transizzjoni li tinvolvi bidla ta' entalpija, dik il-bidla hija indikata b'devjazzjoni endotermika (tidwib) jew eżotermika (iffriżar) mil-linja ta' bażi tar-reġistru tat-temperatura.

1.4.7. **Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar**

Din it-teknika tirreġistra d-differenza fl-enerġija introdotta f' sustanza u dik introdotta f'materjal ta' referenza, bħala funzjoni tat-temperatura, waqt li s-sustanza u l-materjal ta' referenza huma suġġetti għall-istess programm kontrollat ta' temperatura. Din l-enerġija hija l-enerġija meħtieġa biex id-differenza tat-temperatura bejn is-sustanza u l-materjal ta' referenza tinżamm żero. Meta l-kampjun jgħaddi minn transizzjoni li tinvolvi bidla ta' entalpija, dik il-bidla hija indikata b'devjazzjoni endotermika (tgħolija) mil-linja ta' bażi tar-reġistru tal-fluss tas-sħana.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

L-applikabbiltà u l-eżattezza tal-metodi differenti użati għad-determinazzjoni tat-temperatura tat-tgħolija/ta' l-iskala tat-tgħolija huma mniżżla fit-tabella 1:

Tabella 1

Paragun tal-metodi

Metodu ta' kejl	Kalkolu ta' l-eżattezza	Standard eżistenti
L-ebulliometer	± 1,4 K (sa 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (sa 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Il-metodu dinamiku	± 0,5 K (sa 600 K) (2)	
Il-proċess ta' distillazzjoni (skala ta'tgħolija)	± 0,5 K (sa 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Il-metodu skond Siwoloboff	± 2 K (sa 600 K) (2)	
Osservazzjoni permezz ta' fotoċellula	± 0,3 K (sa 373 K) (2)	
Il-kalorimetrija termika differenzjali	± 0,5 K (sa 600 K) ± 2,0 K (sa 1 273 K)	ASTM E 537-76
Il-kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar	± 0,5 K (sa 600 K) ± 2,0 K (sa 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Din l-eżattezza hija valida biss għall-apparat sempliċi kif eż. mfisser f' ASTM D 1120-72; tista' tkun imtejba b' apparati ebulliometer aktar sofistikati.
(2) Validi biss għal sustanzi puri. L-użu f' ċirkustanzi oħra għandu jkun ġustifikat.

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

Kważi l-proċeduri għall-metodi ta' ttestjar kollhatfissru fi standards internazzjonali u nazzjonali (Ara l-Appendiċi).

1.6.1. **L-ebulliometer**

Ara l-Appendiċi.

1.6.2. **Il-metodu dinamiku**

Ara l-metodu ta' ttestjar A.4. għad-determinazzjoni tal-pressjoni tal-fwar.

It-temperatura tat-tgħolija osservata bi pressjoni applikata ta' 101,325 kPa hija reġistrata.

1.6.3. **Il-proċess ta' distillazzjoni (skala tat-tgħolija)**

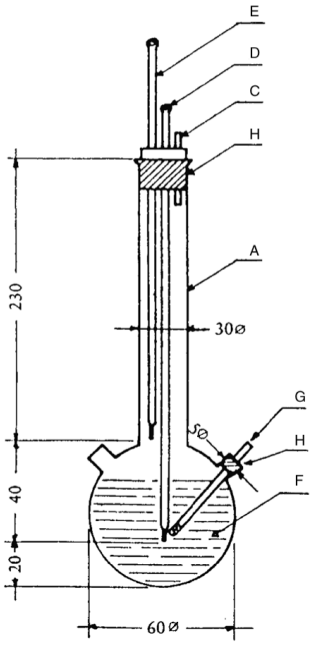
Ara l-Appendiċi.

1.6.4. **Il-metodu skond Siwoloboff**

Il-kampjun jissaħħan f'apparat ta' temperatura tat-tidwib f'tubu għall-kampjun, b'dijametru ta' approssimattivament 5 mm (figura 1).

Il-figura 1 turi tip ta' apparat standardizzat ta' temperatura tat-tidwib u tat-tgħolija (JIS K 0064) (magħmul mill-ħġieġ, l-ispeċifikazzjonijiet kollha f' millimetri).

Figura 1



A: Reċipjent tal-kejl
B: Tapp
C: Fetħar
D: Termometru
E: Termometru awżiljarju
F: Banju ta' likwidu
G: Tubu għall-kampjun, b'dijametru massimu estern ta' 5mm; li fih tubu kapillari, approssimattivament 100 mm twil, approssimattivament dijametru intern ta' 1 mm u ħxuna tas-superfiċje tat-tubu approssimattivament minn 0,2 sa 0,3 mm
H: Tubu tal-ġenb

Tubu kapillari (kapillari tat-tgħolija) li huwa magħluq madwar 1 cm 'il fuq mill-parti t'isfel tat-tubu jitpoġġa fit-tubu għall-kampjun. Is-sustanza tat-test tiżdied sa livell tali li l-parti mgħaqqda tal-kapillari tkun taħt il-wiċċ tal-likwidu. It-tubu għall-kampjun li fih il-kapillari tat-tgħolija huwa marbut mat-termometru permezz ta' lastiku jew huwa mwaħħal b'irfid mal-ġenb (ara figura 2).

▼B

Figura 2

Il-prinċipju skond Siwoloboff

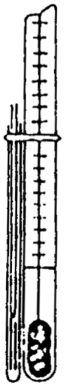
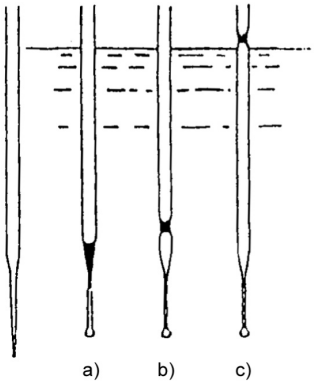


Figura 3

Il-prinċipju mmodifikat



Il-banju ta' likwidu jintgħażel skond it-temperatura tat-tgħolija. F' temperaturi ta' 573 K, jista' jintuża żejt tas-silikone. Il-paraffina likwida tista' tintuża biss sa 473 K. Għall-bidu t-tisħin tal-banju ta'likwidu għandu jkun aġġustat sa żieda fit-temperatura ta' 3 K/min. Il-banju ta' likwidu jrid jitħawwad. F' madwar 10 K taħt it-temperatura tat-tgħolija mistennija, it-tisħin jitnaqqas sabiex ir-rata fiż-żieda tat-temperatura tkun anqas minn 1 K/min. Meta tkun se tintlaħaq it-temperatura tat-tgħolija, jibdew jitfaċċaw b'mod rapidu bżieżaq fil-kapillari li tkun qed tagħli.

It-temperatura tat-tgħolija hija dik it-temperatura li, fil-waqt ta' tkessiħ momentarju, is-serje ta' bżieżaq tieqaf u l-fluwidu f' daqqa waħda jerġa' jibda tiegħla fil-kapillari. Il-qari korrispondenti tat-termometru huwa t-temperatura tat-tgħolija tas-sustanza.

Fil-prinċipju mmodifikat (figura 3) t-temperatura tat-tgħolija hija ddeterminata f'kapillari ta' temperatura tat-tidwib. Hija tiġġebbed sa punt fin ta' madwar 2 cm fit-tul (a) u ammont żgħir tal-kampjun jinġibed 'il fuq. Il-parti l-miftuħa tal-kapillari fin tingħalaq billi tiddewweb, b'mod li jkun hemm buieqa ta' l-arja fit-tarf. Waqt it-tisħin fl-apparat tat-temperatura tat-tidwib (b) l-bużżieqa ta' l-arja tespandi. It-temperatura tat-tgħolija tikkorrispondi mat-temperatura li fiha t-tapp tas-sustanza jilħaq il-livell tas-superfiċje tal-banju ta' likwidu (ċ).

1.6.5. **Osservazzjoni permezz ta' fotoċellula**

Il-kampjun jissaħħan f-tubu kapillari ġo blokka tal-metall imsaħħna.

Raġġ ta' dawl jiġi dirett, f'toqob adattati fil-blokka, minn ġo s-sustanza għal fuq fotoċellula kkalibrata b'mod preċiż.

Waqt iż-żieda fit-temperatura tal-kampjun, bżieżaq ta' l-arja singoli jitfaċċaw mill-kapillari li tkun qed tagħli. Meta tintlaħaq it-temperatura tat-tgħolija n-numru ta' bżieżaq jiżdied ħafna. Dan jikkawża bidla fl-intensità tad-dawl, irreġistrata minn fotoċellula, u jagħti sinjal ta' waqfien lill-indikatur li jkun qed jaqra t-temperatura tat-termometru tal-platinu ta' reżistenza li jkun fil-blokka.

Dan il-metodu huwa speċjalment utli għaliex jippermetti determinazzjonijiet taħt it-temperatura ambjentali sa 253,15 K (-20 °C) mingħajr ebda bidliet fl-apparat. Kemm jitpoġġa l-istrument f'banju li jkessaħ.

▼B

1.6.6. **Analiżi termika**

1.6.6.1. *Analiżi termika differenzjali*

Ara l-Appendiċi.

1.6.6.2. *Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar*

Ara l-Appendiċi.

2. **DATA**

B'devjazzjonijiet żgħar mill-pressjoni normali (max. ± 5 kPa) it-temperaturi tat-tgħolija huma normalizzati sa T_n permezz ta' l-ekwazzjoni numru-valur minn Sidney Young li ġejja:

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

fejn:

$\Delta p = (101{,}325 - p)$ [nnota s-sinjal]

P = il-kejl tal-pressjoni f'kPa

f_T = ir-rata ta' bidla fit-temperatura tat-tgħolija bi pressjoni f'K/kPa

T = it-temperatura tat-tgħolija mkejla f'K

T_n = it-temperatura tat-tgħolija korretta sal-pressjoni normali f'K

Għal ħafna sustanzi l-fatturi tal-korrezzjoni tat-temperatura, f_T, u l-ekwazzjonijiet għall-approssimazzjoni tagħhom huma inklużi fl-istandards internazzjonali u nazzjonali msemmija hawn fuq.

Eż, il-metodu tad-DIN 53171 isemmi l-korrezzjonijiet mhux bilfors eżatti li ġejjin għal solventi inklużi fiż-żebgħa:

Tabella 2

Temperatura – il-fatturi ta' korrezzjonijiet f_t

Temperatura T (K)	Fattur ta' korrezzjoni f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,4
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— il-metodu użat

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet) u l-istadju preliminarju ta' purifikazzjoni, jekk hemm,

— kalkolu ta' l-eżattezza.

Il-medja ta' mill-inqas żewġ temperaturi li huma fl-iskala tal-kalkolu ta' l-eżattezza (ara t-Tabella 1) hija rrapurtata bħala t-temperatura tat-tgħolija.

It-temperaturi tat-tgħolija mkejla u l-medji tagħhom għandhom ikunu ddikjarati u l-pressjoni (jiet) li fihom saru l-kejlijiet għandhom ikunu rrapurtati f'kPa. Il-pressjoni għandha tkun preferibbilment qrib il-pressjoni atmosferika normali.

L-informazzjoni kollha u r-rimarki relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rrapurtati, b'mod speċjali rigward l-impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

4. **REFERENZI**

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

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

(3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Appendiċi

Għal dettalji tekniċi addizzjonali, l-istandards li ġejjin jistgħu jkunu kkonsultati bħala eżempju.

1. **L-ebulliometer**

1.1 Apparati li jiffissaw it-temperatura ta' tidwib b'banju ta' likwidu

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

2. **Il-proċess ta' distillazzjoni (l-iskala tat-tgħolija)**

ISO 918:1989:	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation:determination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **L-analiżi termika differenzjali u l-kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar**

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

▼B

A.3. DENSITÀ RELATTIVA

1. METODU

Il-maġġoranza tal-metodi mfissra huma bbażati fuq il-linja gwida tat-Test OECD (1). Il-prinċipji fundamentali huma mogħtija fir-referenzi (2) u (3).

1.1. DAĦLA

Il-metodi għad-determinazzjoni tad-densità relattiva mfissra hawn huma applikabbli għal sustanzi solidi u likwidi, mingħajr restrizzjoni fir-rigward tal-grad ta' purità tagħhom. Id-diversi metodi li għandhom jintużaw huma mniżżla fit-tabella 1.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Id-densità relattiva D^{20}_4 ta' solidi jew likwidi hija l-proporzjoni bejn il-piż ta' volum tas-sustanza li trid tiġi eżaminata, iddeterminata f'temperatura ta' 20 °C, u l-piż ta' l-istess volum ta' ilma, iddeterminata f'temperatura ta' 4 °C. Id-densità relattiva ma għandhiex dimensjoni.

Id-densità, P, ta' sustanza hija l-kwozjent tal-piż, m, u l-volum tagħha, v.

Id-densità, P, tingħata f'unitajiet SI, f'kg/m3.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA (1) (3)

M'hemmx bżonn li jintużaw sustanzi ta' referenza kull meta tkun qed tiġi investigata sustanza ġdida. Huma primarjament qegħdin biex ikun iċċekkjat ir-rendiment tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu paragun ma' riżultati minn metodi oħra.

1.4. TQABBIL TAL-METODI

Jintużaw erba' klassijiet ta' metodi

1.4.1. **Il-metodi taż-żamma fil-wiċċ**

1.4.1.1. *Idrometru* (għal sustanzi likwidi)

Jistgħu jinkisbu determinazzjonijiet tad-densità rapidi u eżatti biżżejjed permezz ta' idrometri li jżommu fil-wiċċ, li jippermettu li d-densità ta' likwidu titqies mill-fond ta' l-immersjoni bil-qari ta' skala bi gradazzjoni.

1.4.1.2. *Miżien idrostatiku* (għal sustanzi likwidi u solidi)

Id-differenza bejn il-piż tal-kampjun għat-test imkejjel fl-ajru u f'likwidu adattat (eż. l-ilma) tista' tintuża biex tiddetermina d-densità tiegħu.

Għal solidi, id-densità mkejla hija kkunsidrata valida biss għal kampjun partikolari li jkun qed jiġi eżaminat. Għad-determinazzjoni tad-densità tal-likwidi, oġġett ta' volum magħruf, v, jintiżen l-ewwel fl-arja u imbagħad fil-likwidu.

1.4.1.3. *Il-metodu ta' l-oġġett mgħaddas* (għal sustanzi likwidi) (4)

F'dan il-metodu, id-densità ta' likwidu hija ddeterminata mid-differenza bejn ir-riżultati ta' kejl tal-likwidu qabel u wara l-immersjoni ta' oġġett ta' volum magħruf fil-likwidu tat-test.

▼B

1.4.2. **Metodi piknometriċi**

Għal solidi jew likwidi, jistgħu jintużaw piknometri ta' diversi forom u ta' volumi magħrufa. Id-densità hija kkalkulata mid-differenza fil-piż bejn il-piknometru mimli u vojt u l-volum magħruf tiegħu.

1.4.3. **Piknometru għal paragun fl-arja** (għal solidi)

Id-densità ta' solidu fi kwalunkwe forma tista' titkejjel f'temperatura ambjentali b'piknometru għal paragun bil-gass. Il-volum tas-sustanza jitkejjel fl-arja jew f'gass inert f'ċilindru ta' volum varjabbli ikkalibrat. Għal kalkolu tad-densità jittieħed kejl wieħed tal-piż wara li jsir il-kejl tal-volum.

1.4.4. **Densitometru li joxxilla** (5) (6) (7)

Id-densità ta' likwidu tista' titkejjel f'densitometru li joxxilla. Oxxillatur mekkaniku mibni fil-forma ta' tubu-U jiġi vvibrat bil-frekwenza ta' reżonanza ta' l-oxxilatur li tiddependi fuq il-piż tiegħu. L-introduzzjoni ta' kampjun tbiddel il-frekwenza ta' reżonanza ta' l-oxxillatur. L-apparat għandu jiġi kkalibrat b'żewġ sustanzi likwidi ta' densitajiet magħrufa. Dawn is-sustanzi għandhom ikunu preferibbilment magħżula b'tali mod li d-densitajiet tagħhom ikopru l-iskala kollha li se titkejjel.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

L-applikabilità tal-metodi differenti użati għad-determinazzjoni tad-densità relattiva hija mniżżla fit-tabella.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

L-istandards mogħtija bħala eżempji, li għandhom ikunu kkonsultati għal dettalji tekniċi addizzjonali, huma mehmuża fl-Appendiċi.

Il-testijiet għandhom isiru f'temperatura ta' 20 °C, u għandhom isiru għall-inqas żewġ kejlijiet.

2. **DATA**

Ara l-istandards.

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— il-metodu użat,

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet) u l-istadju preliminarju ta' purifikazzjoni, jekk hemm,

Id-densità relattiva, D_4^{20}, għandha tkun irrappurtata kif imfisser f'1.2, flimkien ma' l-istat fiżiku tas-sustanza mkejla.

L-informazzjoni u r-rimarki kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rrapportati, b'mod speċjali fir-rigward ta' l-impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

▼B

Tabella

Applikabilità tal-metodi

Metodu ta' kejl	Densità		Viskożità dinamika massima possibbli	Standards eżistenti
	solidu	likwidu		
1.4.1.1. Idrometru		iva	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Miżien Idrostatiku				
(a) solidsi	iva			ISO 1183 (A)
(b) likwidi		iva	5 Pa s	ISO 90 u 758
1.4.1.3. Il-metodu ta' l-oġġett mgħaddas		iva	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometru				ISO 3507
(a) solidi	iva			ISO 1183(B), NF T 20-053
(b) likwidi		iva	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Piknometru għal paragun fl-arja	iva			DIN 55590 Teil 3, DIN53243
1.4.4. Densitometru li joxxilla		iva	5 Pa s	

M4. **REFERENZI**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

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

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

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.ll, 427–430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297–302.

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

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Braureilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼B

Appendiċi

Għal dettalji tekniċi addizzjonali, l-istandards li ġejjin jistgħu jkunu kkonsultati bħala eżempju.

1. **Il-metodi taż-żamma fil-wiċċ**

1.1 Idrometru

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

1.2 Miżien idrostatiku

Għal sustanzi solidi

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

Għal sustanzi likwidi

ISO 901	ISO 758

▼B

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

1.3 Metodu tat-tagħdis ta' l-oġġett

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

2. **Metodi piknometriċi**

2.1. Għal sustanzi likwidi

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than l00. 10-6 m2 s-1 at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than l00. 10-6 m2 s-1 at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

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

▼B

2.2. Għal sustanzi solidi

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

3. **Piknometru għat-tqabbil ma' l-arja**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. PRESSJONI TA' FWAR

1. METODU

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 104 (2004).

1.1. INTORDUZZJONI

Din il-verżjoni riveduta ta' metodu A 4 (1) tinkludi metodu addizzjonali, Metodu ta' effużjoni: termogravimetrija iżotermali, maħsuba għal sustanzi kimiċi bi pressjonijiet baxxi ħafna (sa 10^{-10} Pa). Fid-dawl ta' bżonnijiet għal proċeduri, speċjalment relati mal-kisba ta' pressjoni ta' fwar għal sustanzi bi pressjoni baxxa ta' fwar, proċeduri oħra ta' dan il-metodu huma vvalutati mill-ġdid b'konnessjoni ma' sensiliet oħra ta' applikabilità.

Fl-ekwilibriju termodinamiku l-pressjoni ta' fwar ta' sustanza pura hija l-funzjoni ta' temperatura biss. Il-prinċipji fundamentali huma deskritti x'imkien ieħor (2)(3).

L-ebda proċedura ta' kejl waħidha hija applikabbli għas-sensiela sħiħa ta' pressjonijiet ta' fwar minn inqas minn 10^{-10} għal 10^{5} Pa. Tmien metodi biex titkejjel il-pressjoni ta' fwar huma inklużi f'dan il-metodu li jista' jiġi applikat f'sensiliet differenti ta' pressjoni ta' fwar. Il-metodi varji huma paragunati rigward l-applikazzjoni u s-sensiela ta' kejl f' Tabella 1. Il-metodi jistgħu jiġu applikati biss għal komposti li ma jinħallux fil-kundizzjonijiet tat-test. F'każijiet fejn il-metodi esperimentali ma jistgħux jiġu applikati minħabba raġunijiet tekniċi, il-pressjoni ta' fwar tista' tiġi stmata, u metodu ta' stima rrikmandat huwa spjegat fl-Appendiċi.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Il-pressjoni ta' fwar ta' sustanza hija definita bħala l-pressjoni ta' saturazzjoni fuq sustanza solida jew likwida.

L-unità SI ta' pressjoni, li hija l-pascal (Pa), għandha tiġi użata. Unità oħrajn li ġew użati storikament se jingħataw hawn taħt, flimkien mal-fatturi ta' konverżjoni tagħhom:

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

1 atmosphere = $1{,}013 \times 10^{5}$ Pa

1 bar = 10^{5} Pa

L-unità SI ta' temperatura hija l-kelvin (K). Il-konverżjoni ta' gradi Celsius għal kelvin hija skont il-formula:

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

fejn, T hija l-Kelvin jew temperatura termodinamika u t hija t-temperatura Celsius

▼**M1**

Tabella 1

Metodu ta' kejl	Sustanzi		Ripetibbiltà stmata	Riproduċibbilità stmata	Sensiela rakkomandata
	Solid	Liquid			
Metodu dinamiku	Jinħall malajr	Iva	sa 25 % 1 sa 5 %	sa 25 % 1 sa 5 %	10^3 Pa sa $2*10^3$ Pa $2*10^3$ Pa sa 10^5 Pa
Metodu statiku	Iva	Iva	5 sa 10 %	5 sa 10 %	10 Pa sa 10^5 Pa 10^{-2} Pa sa 10^5 Pa (1)
Metodu iżoteniskopju	Iva	Iva	5 sa 10 %	5 sa 10 %	10^2 Pa sa 10^5 Pa
Metodu ta' effużjoni: bilanċ ta' pressjoni ta' fwar	Iva	Iva	5 sa 20 %	sa 50 %	10^{-3} sa 1 Pa
Metodu ta' effużjoni: Ċellula Knudsen	Iva	Iva	10 sa 30 %	—	10^{-10} sa 1 P
Metodu ta' effużjoni: termogravimetrija iżotermali	Iva	Iva	5 sa 30 %	sa 50 %	10^{-10} sa 1 Pa
Metodu ta' saturazzjoni ta' gass	Iva	Iva	10 sa 30 %	sa 50 %	10^{-10} sa 10^3 Pa
Metodu ta' dawwâr jdur fuqu nnifsu	Iva	Iva	10 sa 20 %	—	10^{-4} sa 0.5 Pa

(1) Meta tu¿a capacitance manometer

1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST

Ġeneralment, il-pressjoni ta' fwar hija determinata f'temperaturi varji. F'sensiela ta' temperatura limitata, il-logaritmu tal-pressjoni ta' fwar ta' sustanza pura hija funzjoni lineari tal-invers tat-temperatura termodinamika skont l-ekwazzjoni Clapeyron-Clausius simplifikata.

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

fejn:

p = huwa l-pressjoni ta' fwar f'pascals

ΔHv = is-sħana ta' vaporizzazzjoni f'J mol^{-1}

R = il-kostanti universali ta' gass, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = it-temperatura f'K

▼M1

1.4. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta’ referenza ma għandhomx għalfejn jiġu użati. Huma utli primarjament biex jiġi ċċekjat ir-rendiment ta’ metodu minn żmien għall-ieħor u kif ukoll biex jippermetti paragun bejn riżultati ta’ metodi differenti.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.5.1. **Metodu dinamiku (Metodu ta’ Cottrell)**

1.5.1.1. *Prinċipju*

Il-pressjoni ta’ fwar hija determinata billi titkejjel it-temperatura ta’ togħlija tas-sustanzi f’pressjonijiet varji speċifikati bejn wieħed u ieħor 10^3 u 10^5 Pa. Dan il-metodu huwa wkoll irrikmandat għad-determinazzjoni tat-temperatura ta’ togħlija. Għal dak l-għan huwa utli sa 600K. It-temperaturi ta’ togħlija ta’ likwidi huma ċirka 0,1 °C ogħla f’fond ta’ 3 sa 4 ċm milli fil-wiċċ minħabba pressjoni idrostatika tal-kolonna ta’ likwidu. Fil-metodu Cottrell (4) it-termometru huwa mqiegħed fil-fwar fuq il-wiċċ tal-likwidu u l-likwidu jagħli jiġi mġiegħel jippompja lilu nnifsu kontinwament fuq il-bozza tat-termometru. Saff irqiq ta’ likwidu li hu f’ekwilibrju mal-fwar fi pressjoni atmosferika jgħatti l-bozza. It-termometru għal-hekk jaqra l-punt ta’ togħlija veru, mingħajr żbalji kkaġunati minn pressjoni ta’ sħana eċċessiva u pressjoni idrostatika. Il-pompa li oriġi-narjament kienet użata minn Cottrell hija murija fil-figura 1. Tubu A jkun fih il-likwidu jagħli. Fil ta’ platinu B issiġillat fil-qiegħ jgħin togħlija uniformi. It-tubu tal-ġenb C jagħti għal kondensatur, u l-għant D jipprevjeni l-kondensat kiesaħ milli jilħaq it-termometru E. Meta l-likwidu f’A jkun jagħli, bżieżaq u likwidu maqbuda mil-lenbut jiġu mferra’ miż-żewġ idejn tal-pompa F fuq il-bozza tat-termometru.

Figura 1

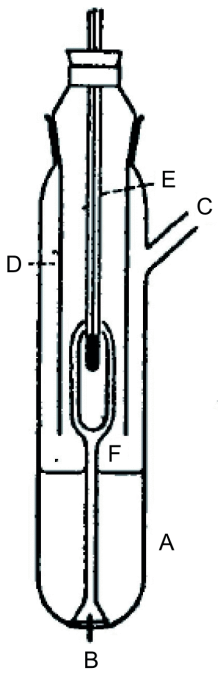
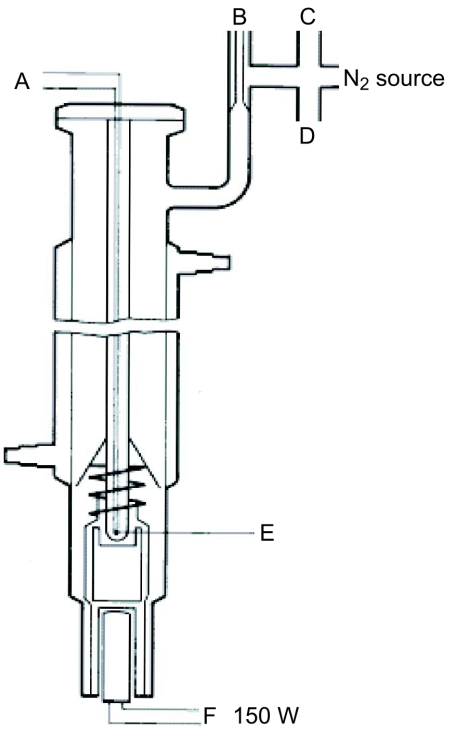


Figura 2



▼**M1**

Pompa ta’ Cottrell (4)

A: Akkopjament termiku

B: Volum ta’ buffer ta’ vojt

C: Arloġġ ta’ pressjoni

D: Vojt

E: Punt ta’ kejl

F: Element li jsaħħan ca. 150 W

1.5.1.2. *Apparat*

Apparat magħmul b’reqqa kbira, li juża l-prinċipju Cottrell, huwa muri fil-figura 2. Jikkonsisti f'tubu b'sezzjoni ta' togħlija fil-parti l-iktar baxxa, apparat li jkessaħ fil-parti tan-nofs, u ftuħ u xifer fil-parti iktar ’il fuq. Il-pompa Cottrell hija mqiegħda fis-sezzjoni ta’ togħlija li hija msaħħna permezz ta’ cartridge elettriku. It-temperatura hija mkejla b’akkopjament termiku mgħotti b'materjal li jifred, jew termometru ta' reżistenza li jidħol minn max-xifer ta' fuq. Il-ftuħ huwa mwaħħal mas-sistema ta’ regolazzjoni ta’ pressjoni. Dan tal-aħħar jikkonsisti f’pompa ta’ vojt, volum ta’ buffer, manostat biex jerħi n-nitroġenu jidħol sabiex tiġi regolata l-pressjoni u manometru.

1.5.1.3. *Proċedura*

Is-sustanza hija mqiegħda fis-sezzjoni ta’ togħlija. Jistgħu jinħolqu problemi rigward solidi li mhumiex trab iżda dawn jistgħu xi kultant jissolvew billi jissaħħan il-materjal ta’ kesħa li jgħatti. L-apparat huwa issiġillat fix-xifer u jitneħħa l-gass mis-sustanza. Sustanzi li jipproduċu ragħwa ma jistgħux jiġu mkejla b’dan il-metodu.

L-iktar pressjoni baxxa mixtieqa hija mbagħad issettjata u s-sistema ta’ sħana hija mixgħula. Fl-istess ħin, is-sensur tat-temperatura huwa mwaħħal ma’ reġistratur.

Ekwilibriju jintlaħaq meta temperatura kostanti ta’ togħlija hija rreġistrata waqt pressjoni kostanti. Irid ikun hemm attenzjoni partikolari biex jiġu evitati skossi waqt it-togħlija. Barra minn hekk, kondensazzjoni sħiħa trid isseħħ fuq l-element li jkessaħ. Meta tkun qed tiġi ddeterminata l-pressjoni ta’ fwar ta’ solidi li jinħallu b’mod baxx, għandha tingħata attenzjoni biex il-kondensatur ma’ jitħalliex jeħel.

Wara li jiġi rreġistrat dan il-punt ta’ ekwilibrju, pressjoni ogħla tiġi ssettjata. Il-proċess ikompli b’dan il-mod sakemm tintlaħaq 10^5 Pa (ċirka 5 sa 10 punti ta’ kejl b’kollox). Bħala kontroll, punti ta’ ekwilibriju għandhom jiġu ripetuti bi pressjonijiet inqas.

1.5.2. **Metodu statiku**

1.5.2.1. *Prinċipju*

Fil-metodu statiku (5), il-pressjoni ta’ fwar f’ekwilibriju termodinamiku hija determinata f’temperatura speċifika. Dan il-metodu huwa xieraq għal sustanzi u likwidi u solidi multikomponenti fis-sensiela minn 10^{-1} sa 10^5 u, jekk ikun hemm attenzjoni, anki fis-sensiela 1 sa 10 Pa.

▼**M1**

1.5.2.2. *Apparat*

It-tagħmir jikkonsisti f'banju b'temperatura kostanti (preċiżjoni ta' ± 0,2 K), kontenitur għall-kampjun imwaħħal ma' fil ta' vojt, manometru u sistema li tirregola l-pressjoni. Il-kamra tal-kampjun (figura 3a) hija mwaħħla mal-fil ta' vojt permezz ta' valvola u manometru differenzjali (Tubu U li fih likwidu xieraq tal-manometru) li jservi bħala indikatur ta' zero. Merkurju, silikoni u ftalati huma tajbin għal użu fil-manometru differenzjali, iżda dan jiddependi fuq is-sensiela ta' pressjoni u l-mġiba kimika tas-sustanza tat-test. Madankollu, minħabba bażgħat ta' natura ambjentali, l-użu ta' merkurju għandu jiġi evitat, jekk possibbli. Is-sustanza tat-test ma għandiex tinħall notevolment ġol-likwidu tat-tubu U, jew tagħmel reazzjoni miegħu. Arloġġ ta' pressjoni jista' jintuża minflok tubu U (figura 3b). Għall-manometru, jista' jintuża l-merkurju fis-sensiela minn pressjoni normali 'l isfel sa 102 Pa, waqt li likwidi u ftalati ta' silikon huma tajbin għal użu taħt 10^2 Pa 'l isfel sa 10 Pa. Hemm arloġġi ta' pressjoni oħrajn li jistgħu jintużaw taħt 102 Pa u manometri ta' kapaċità ta' membrana li tissaħħan jistgħu anki jiġu użati taħt 10^{-1} Pa. It-temperatura hija mkejla fuq il-ħajt ta' barra tal-kontenitur li jkun fih il-kampjun jew fil-kontenitur innifsu.

1.5.2.3. *Proċedura*

Billi tuża l-apparat kif deskritt fil-figura 3a, imla t-tubu U bil-likwidu magħżul, li minnu jrid jitneħħa l-gass f'temperatura għolja qabel ma jittieħdu l-valuri. Is-sustanza tat-test titqiegħed fit-tagħmir u minnha jitneħħa l-gass f'temperatura mnaqqsa. F'każ ta' kampjun b'komponent multiplu, it-temperatura trid tkun baxxa biżżejjed biex tiżgura li l-kompożizzjoni tal-materjal ma tinbidilx. L-ekwilibriju jista' jintlaħaq iktar malajr billi tħawwad il-kampjun. Il-kampjun jista' jiġi mkessaħ b'nitroġenu likwidu jew silġ niexef, iżda għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata l-kondensazzjoni tal-arja jew tal-likwidu tal-pompa. Bil-valvola fuq il-kontenitur kampjun miftuħa, għandha tiġi applikata aspirazzjoni għal ftit minuti sabiex titneħħa l-arja. Jekk ikun neċessarju, l-operazzjoni ta' tneħħija ta' gass tiġi ripetuta għal diversi drabi.

Figura 3a

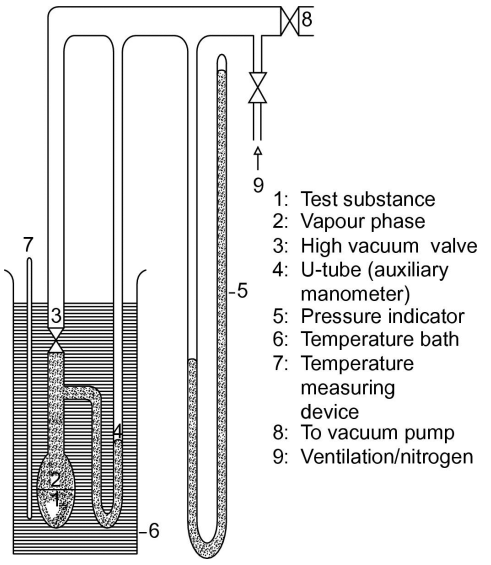
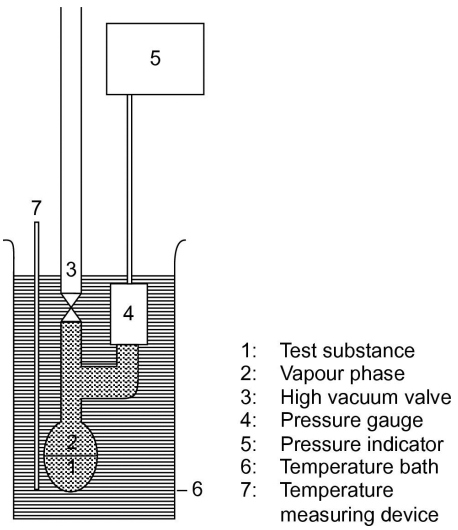


Figura 3b



▼**M1**

Meta l-kampjun jiġi msaħħan bil-valvola magħluqa, il-pressjoni tal-fwar tiżdied. Dan jibdel l-ekwilibriju tal-likwidu fit-tubu U. Sabiex jagħmel tajjeb għal dan, nitroġenu jew arja jiddaħħal/tiddaħħal fit-tagħmir sakemm l-indikatur ta' pressjoni differenzjali jerġa' jiġi żero. Il-pressjoni meħtieġa għal dan tista' tinqara mill-manometru jew minn għodda ta' preċiżjoni ikbar. Din il-pressjoni taqbel mal-pressjoni ta' fwar tas-sustanza fit-temperatura tal-kejl. Billi tuża l-apparat deskritt fil-figura 3 b, il-pressjoni ta' fwar tinqara direttament.

Il-pressjoni ta' fwar hija determinata f'intervalli ta' temperaturi konvenjentement żgħar (ċirka 5 sa 10 punti ta' kejl b'kollox) sal-massimu tat-temperatura mixtieqa.

Indikazzjonijiet f'temperatura baxxa għandhom jiġu ripetuti bħala kontroll. Jekk il-valuri miġjuba mill-indikazzjonijiet ripetuti ma jaqblux mal-kurva li tindika temperatura għola, dan jista' jkun minħabba waħda minn dawn is-sitwazzjonijiet li ġejjin:

i) il-kampjun għad fih l-arja (eż fil-każ ta' materjali viskuży ħafna) jew sustanzi b'togħlija baxxa li joħorġu waqt li jkun qed jiġi msaħħan;

ii) is-sustanza tkun suġġetta għal reazzjoni kimika fis-sensiela ta' temperaturi mistħarrġa (eż dekompożizzjoni, polimerizzazzjoni).

1.5.3. **Metodu ta' Iżoteniskopju**

1.5.3.1. *Prinċipju*

L-iżoteniskopju (6) hu bbażat fuq il-prinċipju tal-metodu statiku. Il-metodu jinvolvi li tpoġġi kampjun f'bozza miżmuma f'temperatura kostanti u mwaħħla ma' manometru u pompa ta' vojt. Impuritajiet iktar volatili mis-sustanza huma mneħħija billi jitneħħa l-gass fi pressjoni imnaqqsa. Il-pressjoni ta' fwar tal-kampjun f'temperaturi magħżula hija bilanċjata bi pressjoni magħrufa ta' gass li ma jagħmilx reazzjoni. L-iżoteniskopju kien żviluppat biex ikejjel il-pressjoni ta' fwar ta' ċerti idrokarboni likwidi iżda hija adegwata għall-investigazzjoni ta' solidi wkoll. Il-metodu ma huwiex ġeneralment xieraq għal sistemi b'iktar minn komponent wieħed. Ir-riżultati huma suġġetti biss għal żbalji żgħar f'każ ta' kampjuni ta' impuritajiet mhux volatili. Is-sensiela rrikmandata hija 10^2 sa 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Apparat*

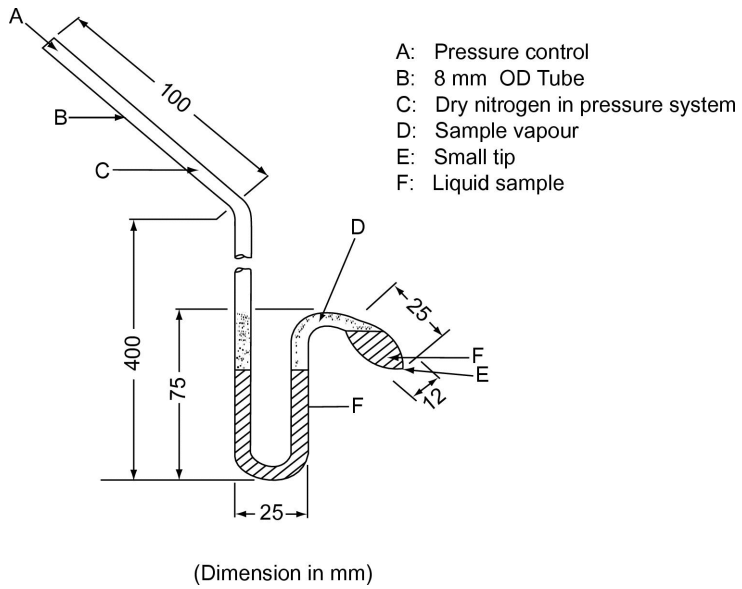
Eżempju ta' tagħmir ta' kejl huwa muri fil-figura 4. Deskrizzjoni sħiħa tinsab f'ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Proċedura*

Fil-każ ta' likwidi, is-sustanza nnifisha sservi bħala l-likwidu fil-manometru differenzjali. Kwantità tal-likwidu, biżżejjed biex timla l-bozza u l-iqsar sieq tal-manometru, hija mqiegħda fuq l-iżoteniskopju. L-iżoteniskopju huwa mwaħħal ma' sistema ta' vojt u mbattal, imbagħad mimli bin-nitroġenu. It-tbattil u t-tisfija tas-sistema huma ripetuti darbtjen biex jitneħħa l-ossiġnu li jifdal. L-iżoteniskopju mimli huwa mqiegħed f'pożizzjoni orizzontali sabiex il-kampjun jinxtered u jifforma saff irqieq fil-bozza tal-kampjun u manometru. Il-pressjoni tas-sistema titnaqqas għal 133 Pa u l-kampjun huwa msaħħan bil-mod sakemm jagħli (tneħħija ta' gassijiet maħlula). L-iżoteniskpju huwa mbagħad imqiegħed b'ċertu mod li l-kampjun jirritorna lejn il-bozza u jimla s-sieq il-qasira tal-manometru. Il-pressjoni tinżamm 133 Pa. Il-qarnuna maħruġa 'l barra tal-bozza tal-kampjun hija msaħħna bi fjamma żgħira sakemm il-fwar tal-kampjun li joħroġ jespandi biżżejjed b'mod li jħarrek parti mill-kampjun mill-parti l-iktar 'l fuq tal-bozza u id tal-manometru u jqiegħda fil-manometru, waqt li joħloq spazzju mimli bil-fwar u ħieles minn nitroġenu. L-iżoteniskopju huwa mbagħad imqiegħed f'banju b'temperatura kostanti, u l-pressjoni tan-nitroġenu hija aġġustata sakemm tiġi daqs dik tal-kampjun. Fl-ekwilibriju, il-pressjoni tan-nitroġenu tiġi daqs dik tal-fwar tas-sustanza.

Figura 4



(Dimension in mm)

F'każ ta' solidi, u jiddependi fuq is-sensiliet ta' pressjoni u temperatura, likwidi tal-manometru bħal likwidi u ftalati ta' silikon huma użati. Il-likwidu ta' manometru bla gass huwa mqiegħed ġol-biċċa maħruġa l-barra fuq l-id it-twila tal-iżoteniskopju. Imbagħad is-solidu li se jiġi mistħarreġ jitqiegħed fil-bozza ta' kampjun u minnu jitneħħa l-gass f'temperatura għolja. Wara dak, l-iżoteniskopju jiġi mmejjel sabiex il-likwidu ta' manometru jkun jista' jidħol fit-tubu U.

▼M1

1.5.4. **Metodu ta' effużjoni: bilanċ ta’ pressjoni ta’ fwar** (7)

1.5.4.1. *Prinċipju*

Kampjun tas-sustanza tat-test jiġi msaħħan f’forn żgħir u mqiegħed f’vażett forma ta’ qampiena (bell jar) mbattal. Il-forn huwa mgħotti b’għatu li fih toqob zgħar ta’ dijametri magħrufa. Il-fwar tas-sustanza, li joħroġ minn waħda mit-toqob, huwa mmexxi għal fuq plattina ta’ miżien sensittiv ħafna li huwa wkoll magħluq fil-vażett forma ta’ qampiena. F’xi diżinni l-plattina tal-miżien hija mdawwra b’kaxxa li tkessaħ li tipprovdi ħruġ ta' sħana 'l barra permezz ta’ konduzzjoni termika, u hija mkessħa b’radjazzjoni sabiex il-fwar li joħroġ jikkondensa fuqha. Il-momentum tal-merżuq ta’ fwar jaħdem bħala forza fuq il-miżien. Il-pressjoni ta’ fwar tista’ tiġi b’żewġ modi: direttament mill-forza fuq il-plattina tal-miżien u wkoll mir-rata ta' evaporazzjoni li tuża l-ekwazzjoni Hertz-Knudsen (2):

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

fejn:

G = rata ta’ evaporazzjoni (kg s^{-1} m^{-2})

M = massa molari (g mol^{-1})

T = temperatura (K)

R = kostanti universali ta’ gass (J mol^{-1} K^{-1})

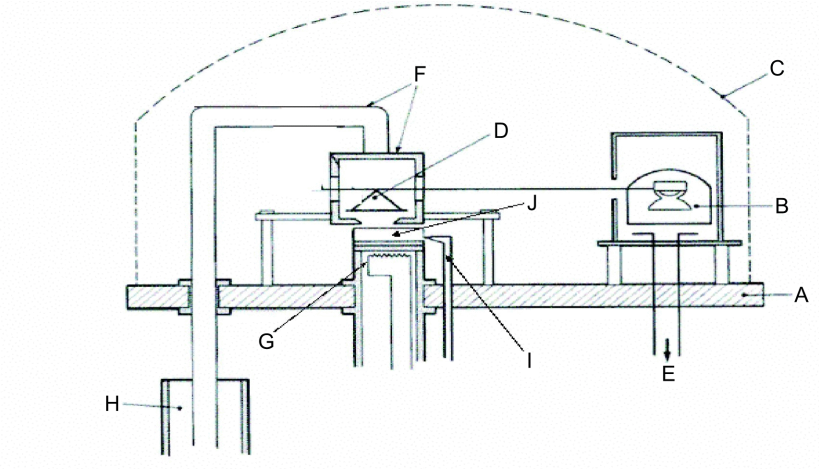
P = pressjoni ta’ fwar (Pa)

Is-sensiela rrikmandata hija minn 10^{-3} sa 1 Pa.

1.5.4.2. *Apparat*

Il-prinċipju ġenerali tal-apparat huwa muri fil-figura 5.

Figura 5



A: Sett ta’ bażi

B: Għodda bi spirall jimxi

C: Vażett forma ta’ qampiena

D: Miżien bi plattina

E: Dispożittiv li jkejjel il-vojt

F: Kaxxa li tkessaħ u lasta li tkessaħ

G: Forn evaporatur

H: Kunjett Dewar b’nitroġenu likwidu

I: Kejl ta’ temperatura ta' kampjun

J: Sustanza tat-test

▼M1

1.5.5. **Metodu ta' effużjoni: Ċellula Knudsen**

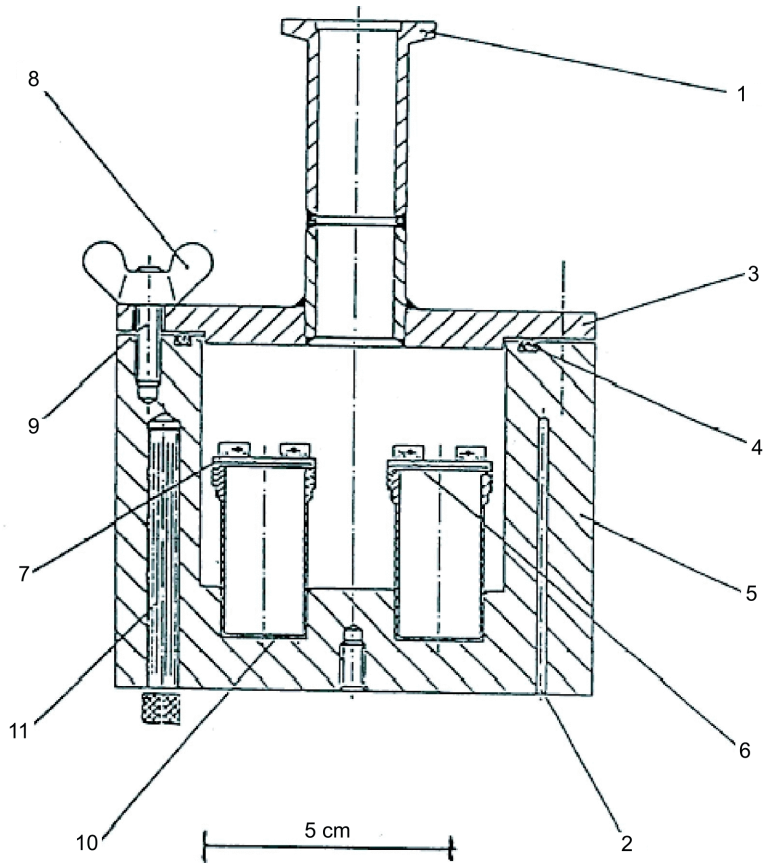
1.5.5.1. *Prinċipju*

Dan il-metodu huwa bbażat fuq stima tal-massa tas-sustanza tat-test ħierġa 'l barra għal kull unità ta' ħin ta' ċellula Knudsen (8) f'forma ta' fwar, minn toqba żgħira ħafna f'kundizzjonijiet estremi ta' vojt. Il-massa ta' fwar li ħareġ tista' tinstab jew billi jiġi ddeterminat it-telf tal-massa taċ-ċellula jew billi jiġi kkondensat il-fwar f'temperatura baxxa u jiġi ddeterminat l-ammont ta' sustanza volatilizzata permezz ta' kromatografija. Il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata billi tiġi applikata r-relazzjoni ta' Hertz-Knudsen (ara t-taqsima 1.5.4.1) ma' fatturi korrettivi li jiddependu fuq il-parametri tal-apparat (9). Is-sensiela rrikmandata hija 10^{-10} to 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Apparat*

Il-prinċipju ġenerali tal-apparat huwa muri fil-figura 6.

Figura 6



1: Konnessjoni mal-vojt

2: Bjar minn termometru ta' reżistenza tal-platinu jew kejl ta' temperature u kontroll

3: Għatu għat-tank tal-vojt

4: Ċirku-O

5: Tank tal-vojt tal-aluminju

6: Dispożittiv biex tinstalla u tneħħi ċ-ċelloli ta' effużjoni

7: Għatu meħjut

8: Skorfini farfett

9: Viti

10: Ċelluli ta' effużjoni b'ħadid li ma jissaddadx

11: Cartridge li ssaħħan

▼M1

1.5.6. **Metodu ta' effużjoni: termogravimetrija iżotermali**

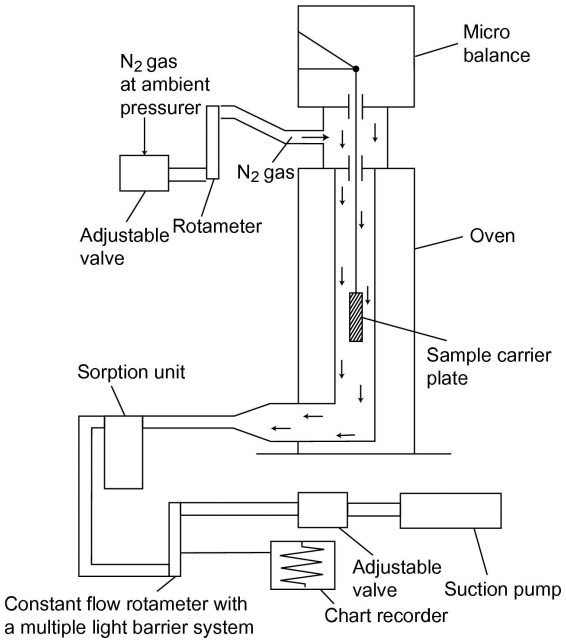
1.5.6.1. *Prinċipju*

Dan il-metodu huwa bbażat fuq id-determinazzjoni ta' rati aċċelerati ta' evaporazzjoni għas-sustanza tat-test f'temperaturi għolja u pressjoni ambjentali bl-użu ta' termogravimetrija (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Ir-rati ta' evaporazzjoni v_T jirriżultaw billi jiġi espost il-kompost magħżul għal atmosfera ta' gass, li ma jagħmilx reazzjoni, għaddej bil-mod, u jiġi kkontrollat it-telf ta'piż f'temperaturi iżotermali definiti T f'Kelvin fuq perjodi xierqa ta' żmien. Il-pressjonijiet ta' fwar p_T huma kkalkulati mill-valuri v_T billi tuża r-relazzjoni lineari bejn il-logaritmu tal-pressjoni ta' fwar u l-logaritmu tar-rata ta' evaporazzjoni. Jekk neċessarju, estrapolazzjoni lil temperaturi ta' 20 u 25 °C tista' ssir b'analiżi ta' regressjoni ta' log p_T vs. 1/T. Dan il-metodu huwa tajjeb għal sustanzi bi pressjonijiet ta' fwar baxxi sa 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) u b'puritá qrib kemm jista' jkun ta' 100 % sabiex tiġi evitata l-miżinterpretazzjoni ta' telf ta' piż imkejjel.

1.5.6.2. *Apparat*

Il-prinċipju ġenerali tat-tagħmir esperimentali huwa muri fil-figura 7.

Figura 7



Il-keffa li ġġorr il-kampjun, imdendel fuq miżien micro f'kamra b'temperatura kkontrollata, huwa miġbud permezz ta' nixxiegħa ta' gass nitroġenu niexef li jġorr il-molekuli vaporizzati tas-sustanza tat-test lil hinn. Wara li tħalli l-kamra, in-nixxiegħa ta' gass hija ppurifikata b'unità ta' assorbiment.

1.5.6.3. *Proċedura*

Is-sustanza ta' test hija applikata fuq il-wiċċ ta' platt aħrax tal-ħġieġ bħala saff omoġeneju. Fil-każ ta' solidi, il-keffa tixxarrab b'mod uniformi b'soluzzjoni tas-sustanza f'solvent xieraq u mnixxef f'atmosfera inerta. Għall-kejl, il-keffa miksija tiġi mdendla għal ġol-analizzatur termogravimetriku u sussegwentement it-telf tal-piż tiegħu jiġi mkejjel kontinwament bħala funzjoni ta' ħin.

▼M1

Ir-rata ta' evaporazzjoni v_T f'temperatura definita hija ikkalkulata mit-telf ta' piż m tal-platt tal-kampjun permezz ta'

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

fejn F hija l-erja tal-wiċċ tas-sustanzi ta' test miksija, normalment l-erja tal-wiċċ tal-platt tal-kampjun, u t huwa l-ħin għat telf ta' piż Δm.

Il-pressjoni ta' fwar p_T hija kkalkulata fuq il-bażi tal-funżjoni tagħha ta' rata ta' evaporazzjoni v_T:

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

fejn C u D huma kostanti speċifiċi għall-arranġament sperimentali użat, jiddependi fuq id-dijametru tal-kamra ta' kejl u fuq ir-rata ta' fluss ta' gass. Dawn il-kostanti għandhom jiġu ddeterminati darba billi jitkejjel sett ta' komposti bi pressjoni ta' fwar magħrufa u log p_T vs. log v_T li jmur lura (11)(21)(22).

Ir-relazzjoni bejn il-pressjoni ta' fwar p_T u t-temperatura T f'Kelvin tingħata permezz ta'

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

fejn A u B huma kostanti miġjuba permezz ta' log p_T vs. 1/T li jmur lura. B'din l-ekwazzjoni, il-pressjoni ta' fwar tista' tiġi kkalkulata għal kull temperatura oħra b'estrapolazzjoni.

1.5.7. **Metodu ta' saturazzjoni ta' gass** (23)

1.5.7.1. *Prinċipju*

Gass inert huwa mgħoddi, f'temperatura ambjentali u b'rata magħrufa ta' fluss, minn u fuq kampjun tas-sustanza tat-test, bil-mod biżżejjed biex jiżgura saturazzjoni. Li tintlaħaq saturazzjoni fil-fażi ta' gass hija ta' importanza kritika. Is-sustanza trasportata hija maqbuda, ġeneralment billi jintuża assorbent, u l-ammont tagħha jiġi ddeterminat. Bħala alternattiva għal qbid ta' fwar u analiżi sussegwenti, tekniki analitiċi in-train, bħal kromatografija ta' gass, jistgħu jiġu użati biex jiġi ddeterminat kwantitattivament l-ammont tal-materjal trasportat. Il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata fuq l-assunzjoni li l-prinċipju ideali ta' gass huwa obdut u li l-pressjoni totali ta' taħlita ta' gassijiet hija daqs s-somma ta' pressjonijiet tal-gassijiet komponenti. Il-pressjoni parzjali tas-sustanza tat-test, i.e. il-pressjoni ta' fwar, hija kkalkulata mill-volum totali ta' gass magħruf u mill-piż tal-materjal trasportat.

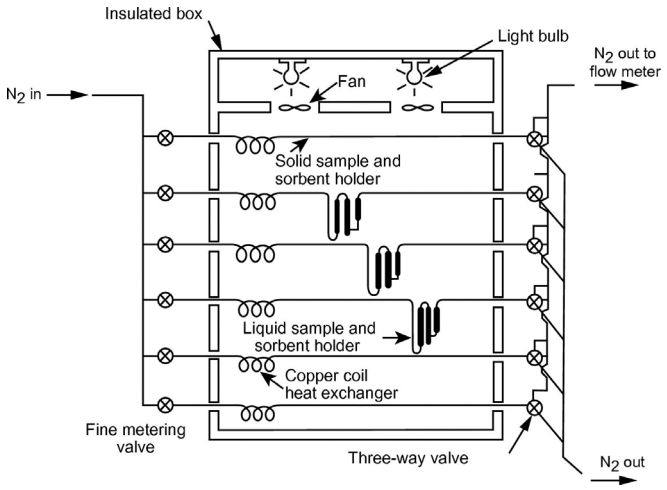
Il-proċedura ta' saturazzjoni ta' gass hija applikabbli għal sustanzi kimiċi solidi jew likwidi. Tista' tiġi użata għal pressjonijiet ta' fwar sa 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Dan il-metodu huwa l-iktar ta' min joqgħod fuqu għal pressjonijiet ta' fwar taħt 10^3 Pa. Fuq 103 Pa, il-pressjonijiet ta' fwar huma ġeneralment stmati żżejjed, probabbilment minħabba tiswir ta' aerosol. Minħabba li l-kejl ta' pressjoni ta' fwar isir f'temperatura ambjentali, m'hemmx bżonn li toħroġ dejta minn temperaturi għolja u ħruġ ta' dejta f'temperaturi għolja, li ta' spiss jikkawżaw żbalji serji, huma evitati.

1.5.7.2. *Apparat*

Din il-proċedura tirrikjedi l-użu ta' kaxxa b'temperatura kostanti. L-iskizz fil-Figura 8 juri kaxxa li fiha tlett kontenituri ta' kampjuni solidi u tlieta oħra għal kampjuni likwidi, li jippermetti analiżi triplikata ta' kampjun solidu jew likwidu. It-temperatura hija kontrollata għal ± 0,5 °C jew aħjar.

▼**M1**

Figura 8



Ġeneralment, nitroġenu huwa użat bħala gass inerti li jġorr iżda, xi drabi, gass ieħor jista' jkun bżonnjuż (24). Il-gass li jġorr għandu jkun niexef. In-nixxiegħa ta' gass tinqasam f'6 nixxigħat, kontrollati minn valvoli labar (b'toqba ta' ċirka 0.79 mm), u jidħol fil-kaxxa minn tubu tar-ram ta' 3.8 mm i.d. Wara ekwilibrazzjoni ta' temperatura, il-gass jgħaddi minn ġol-kampjun u t-trappola assorbenti u joħroġ minn ġol-kaxxa.

Kampjuni solidi jiddaħħlu f'tubu tal-ħġieġ 5 mm i.d. bejn tappijiet ta' suf tal-ħġieġ (ara Figura 9). Figura 10 turi kontenitur ta' kampjun likwidu u sistema ta' assorbiment. L-eħfef metodu ta' kif titkejjel il-pressjoni ta' fwar ta' likwidi huwa li jinksew żibeġ tal-ħġieġ bil-likwidu jew inkella jinkesa assorbent inert bħal silika, u jimtela l-kontenitur b'dawn iż-żibeġ. Bħala alternattiva, il-gass li jġorr jista' jiġi mġiegħel jgħaddi minn ħġieġ aħrax bil-pori u jbaqbaq minn ġo kolonna tas-sustanza likwida tat-test.

Figura 9

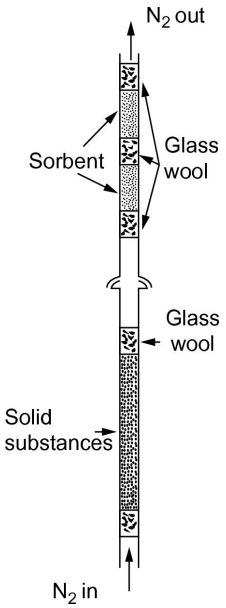
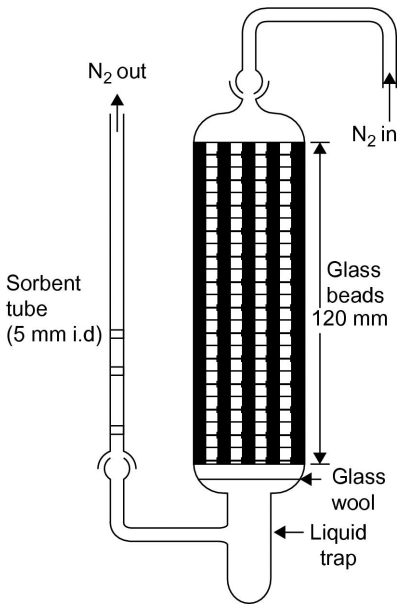


Figura 10



▼**M1**

Is-sistema ta’ assorbent fiha sezzjoni assorbenti fuq quddiem u oħra ta’ sostenn. Fi pressjonijiet ta’ fwar baxxi ħafna, ammonti żgħar biss jinżammu mill-assorbent u l-assorbiment fuq is-suf tal-ħġieġ u t-tubu tal-ħġieġ bejn il-kampjun u l-assorbent tista’ tkun problema serja.

Trappoli mkessħa b’CO_2 solidu huwa metodu effiċjenti ieħor kif jinġabar il-materjal vaporizzat. Huma ma jikkawżaw l-ebda pressjoni b’lura fuq il-kolonna tas-saturatur u huwa ħafif ħafna li kwantitattivament jitneħħa l-materjal maqbud.

1.5.7.3. *Proċedura*

Ir-rata ta' fluss tal-gass ħiereġ li jġorr hija mkejla f’temperatura ambjentali. Ir-rata ta’ fluss hija ċċekjata frekwentament matul l-esperiment biex tiżgura li hemm valur eżatt għall-volum totali ta’ gass li jġorr. Kontroll kontinwu b’apparat li jkejjel il-fluss tal-massa huwa preferut. Saturazzjoni tal-faži ta’ gass tista’ tirrikjedi ħin ta’ kuntatt konsiderevoli u għalhekk rati ta’ fluss aktarx baxxi (25).

Fit-tmiem tal-esperiment, kemm is-sezzjoni ta’ quddiem u kemm dik ta’ sostenn tal-assorbent huma analizzati separatament. Il-kompost fuq kull sezzjoni huwa desorbit billi jiżdied solvent. Is-soluzzjonijiet li jirriżultaw huma analizzati kwantitattivament biex jiġi ddeterminat il-piż desorbit minn kull sezzjoni. L-għażla tal-metodu analitiku (u anki l-għażla ta’ sorbent u solvent desorbenti) hija dettata min-natura tal-materjal tat-test. L-effiċjenza ta’ desorbiment hija determinata billi jiġi injettat ammont magħruf ta’ kampjun fuq is-sorbent, tiddesorbjah u tanalizza l-ammont irkuprat. Huwa importanti li tiġi ċċekjata l-effiċjenza ta’ desorbiment fejn jew qrib il-konċentrazzjoni tal-kampjun fil-kundizzjonijiet tat-test.

Biex tiżgura li l-gass li jġorr huwa saturat bis-sustanza tat-test, tliet rati differenti ta’ fluss ta’ gass huma użati. Jekk il-pressjoni ta’ fwar ikkalkulata ma turi l-ebda dipendenza fuq ir-rata tal-fluss, il-gass huwa kkunsidrat bħala saturat.

Il-pressjoni tal-fwar hija kkalukulata permezz tal-ekwazzjoni:

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

fejn:

p = pressjoni ta’ fwar (Pa)

W = massa ta’ sustanza ta’ test evaporata (g)

V = volum ta’ gass saturat (m^3)

R = kostanti universali ta’ gass 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatura (K)

M = massa molari tas-sustanza tat-test (g mol^{-1})

Volumi mkejla għandhom jiġu rranġati għal differenzi ta' pressjoni u temperatura bejn id-dispożittiv li jikkalkula l-fluss u s-saturatur.

▼M1

1.5.8. **Dawwar li jdur fuqu nnifsu**

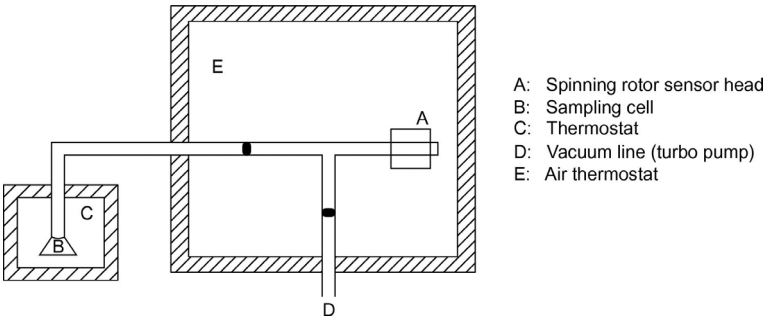
1.5.8.1. *Prinċipju*

Dan il-metodu juża arloġġ ta' viskożità b'dawwâr li jdur fuqu nnifsu, li l-element ta' kejl tiegħu huwa ballun żgħir tal-ħadid li, meta jkun imdendel f'kamp manjetiku, jibda jdur fuqu nnifsu minħabba kampi manjetiċi li jduru (26)(27)(28). Fonorivelaturi jippermettu li r-rata ta' dawrien tiegħu tiġi mkejla. Meta l-ballun ikun laħaq veloċità ta' dawrien stabbilita, normalment ċirka 400 dawra fis-sekonda, l-enerġija titwaqqaf u deċelerazzjoni, minħabba frizzjoni ta' gass, isseħħ. It-tnaqqis fil-veloċità ta' dawrien hija mkejla bħala funzjoni ta' żmien. Il-pressjoni ta' fwar hija mnaqqsa mit-tnaqqis ta' veloċità tal-ballun tal-ħadid ikkawżat mill-pressjoni. Is-sensiela rrikmandata hija minn 10^{-4} sa 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Apparat*

Diżinn skematiku tat-tagħmir sperimentali huwa muri fil-figura 11. Ir-ras ta' kejl hija mqiegħda f'għeluq ta' temperatura kostanti, irregolat b'0,1 °C. Il-kontenitur tal-kampjun hu mqiegħed f'għeluq separat, irregolat ukoll b'0,1 °C. Il-partijiet l-oħra kollha tat-tagħmir huma miżmuma f'temperatura ogħla biex tipprevjeni l-kondensazzjoni. L-apparat kollu huwa mwaħħal ma' sistema elevata ta' vojt.

Figura 11



2. **DEJTA U RAPPURTAR**

2.1. DEJTA

Il-pressjoni ta' fwar minn xi wieħed mill-metodi t'hawn fuq għandha tiġi ddeterminata għal mill-inqas żewġ temperaturi. Tlieta jew iktar huma preferuti fis-sensiela minn 0 sa 50°, sabiex tiġi ċċekjata l-linearità tal-kurva ta' pressjoni ta' fwar. Fil-każ ta' metodu ta' Effużjoni (Ċellula Knudsen u termogravimetrija iżotermali) u metodu ta' saturazzjoni ta' Gass, 120 sa 150 °C hija rrikmandata għas-sensiela ta' kejl ta' temperatura minflok minn 0 sa 50 °C.

2.2. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— metodu użat,

▼M1

— speċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet) u pass preliminarju ta' purifikazzjoni, jekk ikun hemm,

— mill-inqas żewġ valuri ta' pressjoni ta' fwar u temperatura — u preferibbilment tlieta jew iktar — rikjesti fis-sensiela minn 0 sa 50 °C (jew 120 sa 150 °C),

— mill-inqas waħda mit-temperaturi għandha tkun 25 °C jew inqas, jekk teknikament possibli skont il-metodu magħżul,

— id-dejta kollha oriġinali,

— kurva ta' log p versus 1/T,

— stima tal-pressjoni ta' fwar f'20 jew 25 °C.

Jekk tranżizzjoni (bidla ta' stat, dekompożizzjoni) hija osservata, l-informazzjoni li ġejja għandha tiġi nnutata:

— natura tal-bidla,

— temperatura li fiha l-bidla sseħħ fi pressjoni atmosferika,

— pressjoni ta' fwar f'10 u 20 °C inqas mit-temperatura ta' tranżizzjoni u 10 u 20 °C iktar minn din it-temperatura (sakemm it-tranżizzjoni hija minn solidu għal gass).

Kull informazzjoni u rimarki rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom jiġi rrapurtati, speċjalment f'dak li għandu x'jaqsam ma' impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

3. **LETTERATURA**

(1) *Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej* L 383 A, 26-47 (1992).

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

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

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

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

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

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

▼M1

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

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

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

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼M1

Appendiċi

Metodu ta' stima

INTORDUZZJONI

Valuri stmati ta' pressjoni ta' fwar jistgħu jintuzaw:

— biex jiġi deċiż liema metodu sperimentali huwa xieraq;

— biex jipprovdu stima jew valur ta' limitu f'każijiet fejn il-metodu sperimentali ma jistax jiġi applikat minħabba raġunijiet tekniċi.

METODU TA' STIMA

Il-pressjoni ta' fwar ta' likwidi u solidi tista' tiġi stmata bl-użu tal-korrelazzjoni Watson modifikata (a). L-unika dejta sperimentali meħtieġa huwa l-punt normali ta' togħlija. Il-metodu huwa applikabbli għas-sensiela ta' pressjoni minn 10^5 Pa sa 10^{-5} Pa.

Informazzjoni dettaljata fuq il-metodu hija mogħtija fil-"Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (b). Ara wkoll OECD "Environmental Monograph" Nru.67 (c)

PROĊEDURA TA' KALKOLAZZJONI

Il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata kif ġej:

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

fejn:

T = temperatura ta' interess

T_b = punt ta' togħlija normali

P_{VP} = pressjoni ta' fwar f'temperatura T

ΔH_{Vb} = sħana ta' vaporizzazzjoni

ΔZ_b = fattur ta' kompressibilità (stmat f' 0,97)

m = fattur empiriku li jiddependi fuq l-istat fiżiku fit-temperatura ta' interess

Flimkien ma',

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

fejn, K_F hija fattur empiriku li jikkunsidra l-polarità tas-sustanza. Għal xi tipi ta' komposti, fatturi K_F huma elenkati f'riferenza (b).

▼**M1**

Ħafna drabi, teżisti dejta fejn jingħata l-punt ta' togħlija f'pressjoni mnaqqsa. F'każ bħal dan, il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata kif ġej:

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

fejn, T_1 hija l-punt ta' togħlija fil-pressjoni mnaqqsa P1.

RAPPORT

Meta jintuża l-metodu ta' stima, ir-rapport għandu jinkludi dokumentazzjoni komprensiva tal-kalkulazzjoni.

LETTERATURA

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

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

(c) OECD Environmental Monograph Nru.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5. TENSJONI TAS-SUPERFIĊJE

1. METODU

Il-metodi mfissra huma bbażati fuq il-linja gwida tat-Test OECD (1). Il-prinċipji fundamentali huma mogħtija fir-referenzi (2).

1.1. DAĦLA

Il-metodi mfissra għandhom jiġu applikati għall-kejl tat-tensjoni fuq is-superfiċje ta' soluzzjonijiet ta' l-ilma.

Qabel ma jsiru dawn it-testijiet huwa utli li jkollok informazzjoni preliminari dwar is-solubilità ta' l-ilma, l-istruttura, il-proprjetajiet ta' l-idrolisi u l-konċentrazzjoni għall-formazzjoni ta' *micelles* mis-sustanza.

Il-metodi li ġejjin japplikaw għall-parti l-kbira tas-sustanzi kimiċi, mingħajr ebda restrizzjoni fir-rigward tal-grad tal-purità tagħhom.

Il-kejl tat-tensjoni tas-superfiċje bil-metodu tat-*tensiometer* bil-ħolqa huwa ristrett għal soluzzjonijiet fl-ilma b'viskożità dinamika ta' inqas minn approssimattivament 200 mPa s.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

L-entalpija ħielsa tas-superfiċje għal kull unità ta' l-erja tas-superfiċje hija msejħa t-tensjoni tas-superfiċje.

It-tensjoni tas-superfiċje tingħata bħala:

N/m (unità SI) jew

mN/m (sub-unità SI)

1 N/m = 103 dini/cm

1 mN/m = 1 dina/cm fis-sistema cgs li m'għadhiex tintuża

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza mhumiex meħtieġa li jintużaw fil-każijiet kollha meta tkun qed tiġi investigata sustanza ġdida. Huma għandhom iservu primarjament biex minn żmien għal żmien jiċċekkjaw ir-rendiment tal-metodu u sabiex jippermettu tqabbil ma' riżultati minn metodi oħra.

Sustanzi ta' referenza li jkopru firxa kbira ta' tensjoni tas-superfiċje jingħataw fir-referenzi 1 u 3.

1.4. PRINĊIPJI TAL-METODI

Il-metodi huma bbażati fuq il-kejl tal-qawwa massima li hemm bżonn li tkun eżerċitata b'mod vertikali, fuq staffa jew ħolqa f'kuntatt mas-superfiċje tal-likwidu li jkun qed jiġi eżaminat imqiegħed f'reċipjent tal-kejl, bil-għan li jkun separat minn din is-superfiċje, jew fuq pjanċa, bit-tarf f'kuntatt mas-superfiċje, bil-għan li tinġibed ir-rita li tkun ffurmat.

Sustanzi li jinħallu fl-ilma f'millinqas konċentrazzjoni ta' 1 mg/l jiġu ttestjati f'soluzzjoni fl-ilma f'konċentrazzjoni waħda.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Dawn il-metodi kapaċi jagħtu preċiżjoni akbar milli mistennija li tkun meħtieġa għall-valutazzjoni ambjentali.

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

Soluzzjoni tas-sustanza titħejja f'ilma distillat. Il-konċentrazzjoni ta' din is-soluzzjoni għandha tkun 90 % tas-solubilità tas-saturazzjoni tas-sustanza fl-ilma, meta din il-konċentrazzjoni taqbeż 1 g/l, konċentrazzjoni ta' 1 g/l tiġi użata għat-test. Mhux meħtieġ li jkunu ttestjati sustanzi b'solubilità fl-ilma ta' inqas minn 1 mg/l.

1.6.1. **Il-metodu tal-pjanċa**

Ara ISO 304 u NF T 73-060 (Aġenti attivi fis-superfiċje – determinazzjoni tat-tensjoni tas-superfiċje bil-ġbid tar-rita tal-likwidu).

1.6.2. **Metodu ta' l-istaffa**

Ara ISO 304 u NF T 73-060 (Aġenti attivi fis-superfiċje – determinazzjoni tat-tensjoni tas-superfiċje bil-ġbid tar-rita tal-likwidu).

1.6.3. **Metodu tal-ħolqa**

Ara ISO 304 u NF T 73-060 (Aġenti attivi fis-superfiċje – determinazzjoni tat-tensjoni tas-superfiċje bil-ġbid tar-rita tal-likwidu).

1.6.4. **Il-metodu armonizzat tal-ħolqa ta' l-OECD**

1.6.4.1. *Apparat*

Tensiometers disponibbli kummerċjalment huma adegwati għal dan il-kejl. Huma jikkonsistu minn dawn l-elementi:

— il-mejda mobbli għall-kampjun,

— is-sistema ta' kejl tal-qawwa,

— korp tal-kejl,

— reċipjent tal-kejl.

1.6.4.1.1. Mejda mobbli għall-kampjun

Il-mejda mobbli għall-kampjun tintuża bħala rfid għar-reċipjent ta' kejl kontrollat tat-temperatura li jżomm il-likwidu għat-test. Flimkien mas-sistema ta' kejl tal-qawwa, hija mmuntata fuq struttura wieqfa.

1.6.4.1.2. Sistema ta' kejl tal-qawwa

Is-sistema ta' kejl tal-qawwa (ara l-figura) tinsab fuq il-mejda li żżomm il-kampjun. L-iżball ta' kejl tal-qawwa m'għandux jaqbeż ± 10^{-6} N, li jikkorrispondi mal-limitu ta' żball ta' ± 0,1 mg f'kejl ta' piż. F'bosta każijietjiet, l-iskala tal-kejl ta' *tensiometers* disponibbli kummerċjalment hija kkalibrata fi mN/m sabiex it-tensjoni tas-superfiċje tista' tinqara direttament f'mN/m b'eżattezza ta' 0,1 mN/m.

▼B

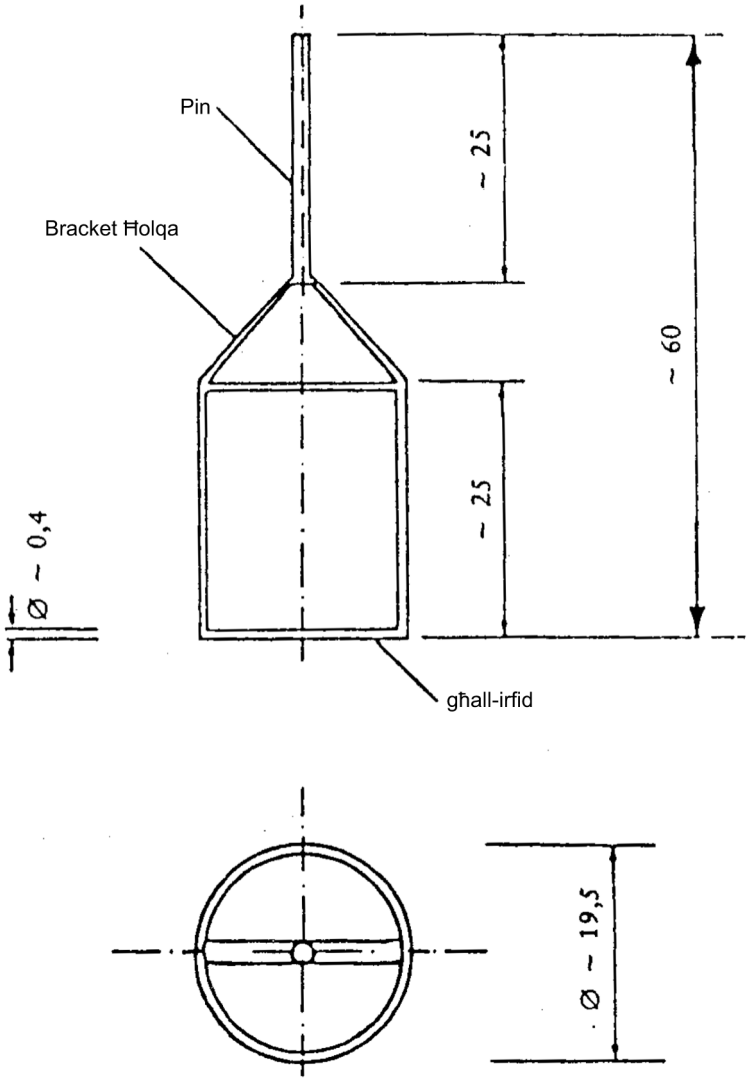
1.6.4.1.3. Korp ta' kejl (ħolqa)

Il-ħolqa hija magħmula normalment minn wajer ta' platinu-iridju ta' madwar 0,4 mm ħxuna u ċirkumferenza medja ta' 60 mm. Il-ħolqa tal-wajer hija sospiża orizzontalment minn pinn tal-metall u brazz tal-wajer għall-immuntar biex tkun stabbilita l-konnessjoni mas-sistema tal-kejl tal-forza (ara l-figura).

Figura

Korp tal-kejl

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



1.6.4.1.4. Reċipjent tal-kejl

Ir-reċipjent tal-kejl li fih is-sustanza tat-test li se tiġi mkejla għandu jkun tal-ħġieġ b'temperatura kkontrollata. Huwa għandu jkun iddisinjat b'tali mod li matul il-kejl it-temperatura tal-likwidu tas-soluzzjoni għat-test u l-faża tal-gass "il fuq mis-superfiċje tibqa" kostanti u li l-kampjun ma jistax jevapora. Huma aċċettabbli reċipjenti ċilindriċi tal-ħġieġ li jkollhom dijametru intern ta' mhux inqas minn 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Preparazzjoni ta' l-apparat*

1.6.4.2.1. T i n d i f

Reċipjenti tal-ħġieġ għandhom jitnaddfu bl-attenzjoni. Jekk neċessarju huma għandhom jinħaslu b'aċidu kromo-sulfuriku, imbagħad b'aċidu fosforiku bħall-ġulepp (minn 83 % sa 98 % mill-piż H_3PO_4), imlaħlaħ sewwa fl-ilma tal-vit u fl-aħħar maħsul b'ilma distillat għal darbtejn sakemm tinkiseb reazzjoni newtrali u susseguentement imnixffa jew imlaħalħa b'parti mil-likwidu tal-kampjun li se jitkejjel.

Il-ħolqa trid l-ewwel titlaħlaħ sewwa fl-ilma biex jitneħħew xi sustanzi li jinħallu fl-ilma, titgħaddaa għal ftit fl-aċidu kromo-sulfuriku, tinħasel f'ilma distillat għal darbtejn sakemm tinkiseb reazzjoni newtrali u finalment tissaħħan ftit fuq fjamma tal-metanol.

Nota:

Il-kontaminazzjoni minn sustanzi li ma jinħallux jew li jinqerdu minn aċidu kromo-sulfuriku jew aċidu fosforiku, bħas-silikone, għandha titneħħa permezz ta' solvent organiku adattat.

1.6.4.2.2. K a l i b r a z z j o n i t a ' l - a p p a r a t

Il-validazzjoni ta' l-apparat tikkonsisti mill-verifika tal-punt żero u minn aġġustament sabiex l-indikazzjoni ta' l-istrument tippermetti determinazzjonali affidabbli f'mN/m.

Immuntar:

L-apparat għandu jkun invellat, eżempju permezz ta' livell ta' l-ispirtu fuq il-bażi tat-*tensiometer,* billi jiġu aġġustati l-viti fil-bażi.

Aġġustament tal-punt żero:

Wara l-immuntar tal-ħolqa fuq l-apparat u qabel ma tkun mgħaddsa fil-likwidu, l-indikazzjoni tat-*tensiometer* għandha tkun aġġustata għal żero u l-ħolqa ċċekkjata għall-parallelliżmu mal-likwidu tas-superfiċje. Għal dan il-għan, il-likwidu tas-superfiċje jista' jintuża bħala mera.

Kalibrazzjonijiet:

Il-kalibrazzjoni tat-test attwali tista' ssir permezz ta' waħda minn dawn iż-żewġ proċeduri:

(a) Bl-użu ta' piż: proċedura bl-użu ta' rikkieba ta' piż magħruf bejn 0,1 u 1,0 g mqiegħdin fuq il-ħolqa. Il-fattur ta' kalibrazzjoni, Φ_a li miegħu jrid jiġi mmultiplikat il-qari kollu ta' l-istrumenti, għandu jkun ddeterminat skond l-ekwazzjoni (1).

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

fejn:

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

m = il-piż tar-rikkieb (g)

g = l-aċċellerazzjoni tal-gravità (981 cm s^{-2} fil-livell tal-baħar)

b = iċ-ċirkumferenza medja tal-ħolqa (cm)

σ_a = il-qari tat-*tensiometer* wara li jitpoġġa r-rikkieb fuq il-ħolqa (mN/m).

▼B

(b) Bl-użu ta' l-ilma: proċedura li tuża ilma pur li t-tensjoni tas-superfiċje tiegħu f'eżempju 23 °C hija ugwali għal 72,3 mN/m. Din il-proċedura titwettaq b'aktar ħeffa mill-kalibrazzjoni tal-piż iżda dejjem hemm il-periklu li t-tensjoni tas-superfiċje ta' l-ilma tkun iffalsifikata minn traċċi ta' kontaminazzjoni mis-surfattanti.

Il-fattur ta' kalibrazzjoni, Φ_a li miegħu jrid jiġi mmultiplikat il-qari kollu ta' l-istrument, għandu jkunu ddeterminat skond l-ekwazzjoni (2).

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

fejn:

σ_o = il-valur ċitat fil-letteratura għat-tensjoni tas-superfiċje ta' l-ilma (mN/m)

σ_g = il-valur mkejjel tat-tensjoni tas-superfiċje ta' l-ilma (mN/m) it-tnejn fl-istess temperatura.

1.6.4.3. *Preparazzjoni tal-kampjuni*

Soluzzjonijiet fl-ilma għandhom jitħejjew mis-sustanzi li se jkunu ttestjati, bl-użu tal-konċentrazzjonijiet meħtieġa fl-ilma, u m'għandhomx jinkludu xi sustanzi li ma nħallux.

Is-soluzzjoni trid tinżamm f'temperatura kostanti (± 0,5 °C). Ladarba t-tensjoni tas-superficje tas-soluzzjoni fir-reċipjent tal-kejl tinbidel fuq perjodu ta' żmien, diversi kejlijiet għandhom isiru f'ħinijiet differenti u ssir kurva li turi t-tensjoni tas-superfiċje bħala funzjoni taż-żmien. Meta ma ssir ebda bidla oħra, ikun intlaħaq stat ta' ekwilibriju.

Kontaminazzjoni ta' trab jew ta' gassijiet minn sustanzi oħra tinterferixxi mal-kejl. Ix-xogħol għalhekk għandu jitwettaq taħt għata ta' protezzjoni.

1.6.5. **Kondizzjonijiet tat-test**

Il-kejl għandu jsir f'approssimattivament 20 °C u għandu jkun ikkontrollat sa ± 0,5 °C,

1.6.6. **L-eżekuzzjoni tat-test**

Is-soluzzjonijiet biex jiġu mkejla għandhom ikunu trasferiti fir-reċipjent tal-kejl imnaddaf sewwa, bl-attenzjoni biex ma jkunx hemm ragħwa, u sussegwentement ir-reċipjent tal-kejl għandu jitpoġġa fuq il-mejda ta' l-apparat tat-test. Il-wiċċ tal-mejda bir-reċipjent tal-kejl għandu jittella' sakemm il-ħolqa titgħaddas taħt il-wiċċ tas-soluzzjoni li se titkejjel. Sussegwentement, il-wiċċ tal-mejda jitbaxxa gradwalment u b'mod ibbalanċjat b'rata ta' approssimattivament 0,5 cm/min) biex tinqala' l-ħolqa mill-wiċċ sakemm tintlaħaq il-forza massima. Is-saff likwidu mwaħħal mal-ħolqa ma jridx jissepara mill-ħolqa. Wara li jintemmu l-kejlijiet, il-ħolqa għandha titbaxxa għal darb'oħra taħt il-wiċċ u l-kejl jiġi ripetut sakemm jintlaħaq valur ta' tensjoni tas-superfiċje kostanti. Il-ħin tat-trasferiment tas-soluzzjoni għar-reċipjent tal-kejl għandu jkun irreġistrat għal kull determinazzjoni. Il-qari għandu jittieħed fil-forza massima meħtieġa biex il-ħolqa tinqala' mill-wiċċ tal-likwidu.

▼B

2. **DATA**

Bil-għan li tkun ikkalkulata t-tensjoni tas-superfiċje, il-valur moqri f'mN/m fuq l-apparat għandu l-ewwel jiġi mmultiplikat bil-fattur tal-kalibrazzjoni Φ_a u Φ_b (jiddependi fuq il-proċedura ta' kalibrazzjoni użata). Dan jagħti valur li japplika biss approssimattivament u għalhekk jeħtieġ korrezzjoni.

Harkins u Jordan (4) iddeterminaw b'mod empiriku fatturi ta' korrezzjoni għall-valuri tat-tensjoni tas-superfiċje mkejla bil-metodu tal-ħolqa li huma dipendenti fuq id-dimensjonijiet tal-ħolqa, id-densità tal-likwidu u t-tensjoni tas-superfiċje tiegħu.

Peress li d-determinazzjoni tal-fattur ta' korrezzjoni għal kull kejl individwali mit-tabelli Harkins and Jordan teħtieġ ħafna xogħol, sabiex tkun ikkalkulata t-tensjoni tas-superfiċje għal soluzzjonijiet fl-ilma tista' tintuża l-proċedura simplifikata tal-qari tal-valuri kkorreġuti tat-tensjoni tas-superfiċje direttament mit-tabella. (Għandha tintuża l-interpolazzjoni għall-qari fl-iskala bejn il-valuri tabulari).

Tabella

Korrezzjoni tat-tensjoni tas-superfiċje mkejla

Għal soluzzjonijiet fl-ilma biss, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (raġġ medju tal-ħolqa)
r	= 0,185 mm (raġġ medju tal-ħolqa)

Valur Sperimentali (mN/m)	Valur Ikkoreġut (mN/m)	
	Kalibrazzjoni tal-piż (ara 1.6.4.2.2(a))	Kalibrazzjoni ta' l-ilma (ara 1.6.4.2.2(b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Valur Sperimentali (mN/m)	Valur Ikkoreġut (mN/m)	
	Kalibrazzjoni tal-piż (ara 1.6.4.2.2(a))	Kalibrazzjoni ta' l-ilma (ara 1.6.4.2.2(b))
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Din it-tabella ġiet kompilata abbażi tal-korrezzjoni Harkins-Jordan. Hija simili għal dik fid-DIN Standard (DIN 53914) għall-ilma u soluzzjonijiet fl-ilma(densità ρ = 1 g/cm^3) u hija għall-ħolqa disponibbli kummerċjalment li għandha d-dimensjonijiet R = 9,55 mm (raġġ medju tal-ħolqa) u r = 0,185 mm (raġġ tal-wajer tal-ħolqa). It-tabella tipprovdi valuri kkorreġuti għall-kejl tat-tensjoni tas-superfiċje meħuda wara l-kalibrazzjoni bil-piżijiet jew il-kalibrazzjoni bl-ilma.

Alternattivament, mingħajr il-kalibrazzjoni preċedenti, it-tensjoni tas-superfiċje tista' tkun ikkalkulata skond il-formula li ġejja:

$$\sigma = \frac{fxF}{4\pi R}$$

fejn:

F = il-forza mkejla fuq id-dinamometru fil-punt tal-ksur tar-rita

R = ir-raġġ tal-ħolqa

f = il-fattur ta' korrezzjoni (1)

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— il-metodu użat,

— it-tip ta' ilma jew is-soluzzjoni użat/a.

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet),

— ir-riżultati tal-kejl: it-tensjoni tas-superfiċje (qari) li juri kemm il-qari individwali u l-medja aritmetika tagħhom kif ukoll il-medja kkorreġuta (jikkunsidraw il-fattur tat-tagħmir u t-tabella ta' korezzjoni),

▼B

— il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni,

— it-temperatura tat-test,

— l-età tas-soluzzjoni użata; b'mod partikulari l-ħin bejn it-Preparazzjoni u l-kejl tas-soluzzjoni,

— id-deskrizzjoni tad-dipendenza fuq il-ħin tat-tensjoni tas-superfiċje wara t-trasferiment tas-soluzzjoni fir-reċipjent tal-kejl.

— l-informazzjoni u r-rimarki kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rrapportati, b'mod speċjali fir-rigward ta' l-impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Meta jkun ikkunsidrat il-fatt li l-ilma distillat għandu tensjoni tas-superfiċje ta' 72,75 mN/m f'20 C, sustanzi li juru tensjoni tas-superfiċje inqas minn 60 mN/m taħt il-kondizzjonijiet ta' dan il-metodu għandhom jitqiesu bħala materjali attivi fis-superfiċje.

4. **REFERENZI**

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

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

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

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

▼M4

A.6. SOLUBILITÀ FL-ILMA

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG - Test Guideline) 105 (1995) tal-OECD. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa verżjoni riveduta tat-TG 105 oriġinali li kienet adottata fl-1981. M'hemm l-ebda differenza sostanzjali bejn il-verżjoni preżenti u dik tal-1981. Prinċipament li nbidel kien il-format. Ir-reviżjoni kienet ibbażata fuq il-Metodu ta' Ttestjar tal-UE "Solubilità fl-Ilma" ([1]).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

2. Is-solubilità fl-ilma ta' sustanza tista' tkun affettwata b'mod konsiderevoli mill-preżenza tal-impuritajiet. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jindirizza d-determinazzjoni tas-solubilità fl-ilma ta' sustanzi essenzjalment puri li huma stabbli fl-ilma u mhux volatili. Qabel ma tkun iddeterminata s-solubilità fl-ilma, ikun utli li tingħata ftit informazzjoni preliminari dwar is-sustanza għall-ittestjar, bħall-formula strutturali, il-pressjoni tal-fwar, il-kostant ta' disassoċjazzjoni u l-idroliżi bħala funzjoni tal-pH.

3. Żewġ metodi, il-metodu ta' elużjoni tal-kolonna u l-metodu tal-flixkun li jkopru rispettivament solubilitajiet taħt u fuq 10^{-2} g/l huma deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar. Huwa wkoll deskritt test preliminari sempliċi. Dan jippermetti d-determinazzjoni ta' approssivament l-ammont xieraq ta' kampjun li għandu jintuża fit-test finali, kif ukoll iż-żmien meħtieġ biex tinkiseb is-saturazzjoni.

DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

4. Is-solubilità fl-ilma ta' sustanza hija l-konċentrazzjoni massa tas-saturazzjoni tas-sustanza fl-ilma f'temperatura partikolari.

5. Is-solubilità fl-ilma hija espressa f'massa ta' solut għal kull volum ta' soluzzjoni. L-unità SI hija kg/m^3 iżda tista' tintuża wkoll g/l.

KIMIĊI TA' REFERENZA

6. Il-kimiċi ta' referenza ma jeħtiġilhomx jintużaw meta tkun qed tiġi investigata sustanza għall-ittestjar.

DESKRIZZJONI TAL-METODI

Kundizzjonijiet tat-test

7. Preferibbilment it-test isir f'20 ± 0,5 °C. It-temperatura għandha tinżamm kostanti fil-partijiet rilevanti kollha tal-apparat.

Test preliminari

8. Fi proċedura pass pass, jiżdiedu volumi ta' ilma dejjem ikbar f'temperatura ambjentali ma' madwar 0,1 g tal-kampjun (is-sustanzi solidi għall-ittestjar għandhom jintaħnu) f'ċilindru bi gradazzjoni ta' 10 ml magħluq b'tapp tal-ħġieġ. Wara kull żieda ta' ammont ta' ilma, it-taħlita titħawwad għal 10 minuti u tiġi kkontrollata viżwalment għal xi partijiet tal-kampjun li ma jkunux inħallu. Jekk wara żieda ta' 10 ml ta' ilma, il-kampjun jew partijiet

▼M4

minnu jibqgħu ma jinħallux, l-esperiment jitkompla f'ċilindru tal-kejl ta' 100 ml. Is-solubilità approssimattiva tinsab fit-Tabella 1 hawn taħt, skont dak il-volum ta' ilma li fih il-kampjun jinħall kompletament. Meta s-solubilità tkun baxxa, jista' jkun meħtieġ ħin twil biex sustanza għall-ittestjar tinħall u għandhom jingħataw mill-anqas 24 siegħa. Jekk wara 24 siegħa s-sustanza għall-ittestjar tkun għadha ma nħallitx, għandu jingħata aktar ħin (sa 96 siegħa) u għandu isir attentat ta' aktar dilwizzjoni biex ikun aċċertat jekk għandux jintuża l-metodu ta' elużjoni tal-kolonna jew il-metodu tal-flixkun.

Tabella 1

ml ta' ilma għal solubbli ta' 0,1 g	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
solubilità approssimattiva f'g/l	> 1 000	1 000 għal 200	200 għal 100	100 għal 50	50 għal 10	10 għal 1	< 1

Metodu ta' elużjoni tal-kolonna

Prinċipju

9. Dan il-metodu huwa bbażat fuq l-elużjoni tas-sustanza għall-ittestjar bl-ilma minn mikrokolonna li tkun mimlija b'materjal ta' rfid inert, li qabel kienet tkun inksiet b'eċċess ta' sustanza għall-ittestjar (2). Is-solubilità fl-ilma tingħata bil-konċentrazzjoni massa tas-sustanza tal-materjal ta' elużjoni meta dan ikun laħaq livell kostanti bħala funzjoni ta' ħin.

Apparat

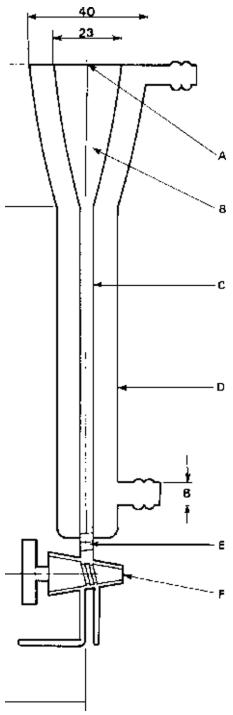
10. L-apparat jikkonsisti f'mikrokolonna (Figura 1), miżmuma f'temperatura kostanti. Huwa mqabbad ma' pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid (Figura 2) jew ma' reċipjent ta' livellar (Figura 3). Il-mikrokolonna jkun fiha rfid inert miżmum f'postu b'tapp żgħir tal-ħġieġ f'forma ta' fibri li jservi wkoll biex jiffiltra l-partiċelli l-barra. Materjali li possibbilment jistgħu jintużaw bħala rfid huma boċċi tal-ħġieġ, trab tad-diatomi jew materjal inert ieħor.

11. Il-mikrokolonna murija fil-Figura 1 hija adattata għall-immuntar b'pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid. Għandha spazju ta' fuq li jipprovdi għal hames volumi ta' ilma tal-qiegħ (skartati fil-bidu tal-esperiment) u l-volum ta' ħames kampjuni (meħudin għal analiżi matul l-esperiment). Alternattivament, id-daqs jista' jitnaqqas jekk ikun jista' jiżdied l-ilma fis-sistema matul l-esperiment biex jieħu post il-ħames volumi tal-qiegħ inizjali mneħħija bl-impuritajiet. Il-kolonna hijaa mqabbda b'tubu ta' materjal intert mal-pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid, li kapaċi twassal 25 ml/h. Il-pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid tista tkun, pereżempju, pompa peristaltika jew bil-membrana. Għandha tingħata attenzjoni biex ma jkun hemm ebda kontaminazzjoni u/jew assorbiment fil-materjal tat-tubu.

12. Arranġament skematiku bl-użu ta' reċipjent ta' livellar jidher fil-Figura 3. F'dan l-arranġament il-mikrokolonna jitwaħħlilha rubinett tal-għeluq unidirezzjonali. Il-konnessjoni mar-reċipjent ta' livellar tikkonsisti f'ġonta tal-qiegħ tal-ħġieġ u tubu magħmul minn materjal inert. Ir-rata ta' fluss mir-reċipjent ta' livellar għandha tkun madwar 25 ml/h.

▼**M4**

Figura 1



Dimensjonijiet f'mm

A. Konnessjoni għal ġonta tal-qiegħ tal-ħġieġ

B. Spazju ta' fuq

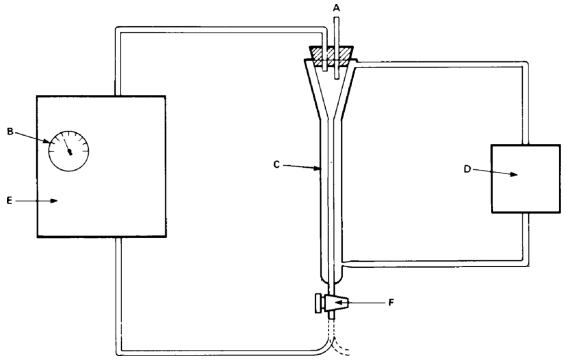
C. Ġewwa 5

D. Barra 19

E. Tapp tal-ħġieġ f'forma ta' fibri

F. Rubinett tal-għeluq

Figura 2



A. Ekwilibrazzjoni atmosferika

B. Apparat li jkejjel il-fluss

C. Mikrokolonna

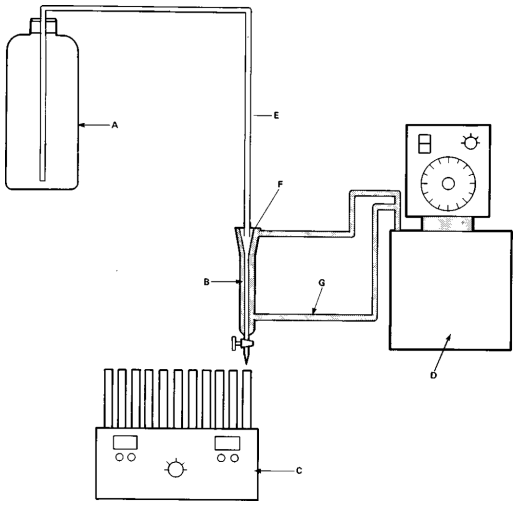
D. Pompa ta' ċirkolazzjoni kkontrollata termostatikament

E. Pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid

F. Valv bidirezzjonali għal teħid ta' kampjuni

▼**M4**

Figura 3



A. Reċipjent ta' livellar (eż. flixkun kimiku ta' 2,5 litri)

B. Kolonna

C. Akkumulatur ta' frazzjoni

D. Termostat

E. Tubu tat-teflon

F. Ġonta tal-qiegħ tal-ħġieġ

G. Livell tal-ilma (bejn it-termostat u l-kolonna, id-dijametru ta' ġewwa huwa madwar 8 mm)

13. Madwar 600 mg ta' materjal ta' rfid jiġi ttrasferit għal ġo flixkun ta' 50 ml b'qiegħ tond. Ammont adattat ta' sustanza għall-ittestjar jinħall f'solvent volatili ta' kwalità ta' reaġent analitiku u ammont li jixraq ta' din is-soluzzjoni jiżdied mal-materjal ta' rfid. Is-solvent jevapora kompletament, eż. billi jintuża evaporatur li jdur, inkella s-saturazzjoni tal-ilma ta' rfid ma tinkisibx matul l-istadju ta' eluzjoni minħabba li jkun hemm partizzjoni fil-wiċċ. Il-materjal ta' rfid imħejji jitgħaddas għal sagħtejn f'madwar 5 ml ilma u s-sospensjoni titferra' fil-mikrokolonna. Alternattivament, jista' jitferra' materjal ta' rfid xott fil-mikrokolonna mimlija ilma u jitħallew sagħtejn għal ekwilibrazzjoni.

14. Il-preparazzjoni tal-materjal ta' rfid tista' tikkawża l-problemi li jwasslu għal riżultati żbaljati, eż. meta s-sustanza għall-ittestjar tiddepożita bħala żejt. Dawn il-problemi għandhom ikunu eżaminati u d-dettalji rrappurtati.

Proċedura li tuża pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid

15. Jinbeda l-fluss mill-kolonna. Huwa rrakkomandat li tintuża rata ta' fluss ta' madwar 25 ml/h, li tikkorrispondi għal 10 volumi ta' ilma tal-qiegħ għal kull siegħa għall-kolonna deskritta. Mill-anqas l-ewwel hames volumi ta' ilma tal-qiegħ ikunu skartati biex jitneħħew l-impuritajiet li jinħallu fl-ilma. Wara dan, il-pompa titħalla taħdem sakemm ikun stabbilit ekwilibriju, kif iddefinit minn ħames kampjuni suċċessivi li l-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jiddifferenzjawx b'aktar minn ± 30 % b'mod aleatorju. Dawn il-kampjuni għandhom ikunu sseparati wieħed mill-ieħor b'intervalli ta' ħin li jikkorrispondu mal-mogħdija ta' mill-anqas għaxar volumi ta' ilma tal-qiegħ. Skont il-metodu analitiku li jintuża, jista' jkun preferibbli li tkun stabbilita kurva ta' konċentrazzjoni/ħin biex turi li jkun intlaħaq ekwilibriju.

▼M4

Proċedura li tuża reċipjent ta' livellar

16. Frazzjonijiet suċċessivi ta' materjal ta' elużjoni għandhom jingabru u jiġu analizzati bil-metodu magħżul. Jintużaw frazzjonijiet mill-firxa tan-nofs tal-materjal ta' elużjoni, fejn il-konċentrazzjonijiet ikunu kostanti fi ± 30 % f'mill-anqas ħames frazzjonijiet konsekuttivi, biex tkun iddeterminata s-solubilità.

17. Ilma ddistillat għal darbtejn huwa l-fluwidu ta' elużjoni ppreferut. Jista' jintuża wkoll ilma dejonizzat b'qawwa ta' reżistenza 'l fuq minn 10 megohms/cm u b'kontenut totali ta' karbonju organiku anqas minn 0,01 %.

18. Skont iż-żewġ proċeduri, terġa' ssir prova oħra b'nofs ir-rata ta' fluss tal-ewwel. Jekk ir-riżultati taż-żewġ provi jkunu jaqblu, it-test ikun sodisfaċenti. Jekk is-solubilità mkejla tkun ogħla mir-rata ta' fluss aktar baxxa, f'dak il-każ it-tnaqqis tar-rata ta' fluss bin-nofs għandu jkompli sakemm żewġ provi suċċessivi jagħtu l-istess solubilità.

19. Fiż-żewġ proċeduri, il-frazzjonijiet għandhom ikunu kkontrollati għall-preżenza ta' materja li twaħħal permezz ta' eżami bl-effett Tyndall. Il-preżenza tal-partiċelli tinvalida t-test u t-test għandu jkun ripetut wara titjib tal-azzjoni filtranti tal-kolonna.

20. Il-pH ta' kull kampjun għandha titkejjel, preferibbilment bl-użu ta' strixex indikaturi speċjali.

Metodu tal-flixkun

Prinċipju

21. Is-sustanza għall-ittestjar (is-solidi għandhom jintaħnu) tinħall fl-ilma f'temperatura ftit ogħla mit-temperatura tat-test. Meta tinkiseb is-saturazzjoni, it-taħlita titkessaħ u tinżamm fit-temperatura tat-test. Alternattivament, u jekk ikun assigurat permezz tat-teħid adattat ta' kampjuni, li jkun intlaħaq l-ekwilibriju tas-saturazzjoni, il-kejl ikun jista' jitwettaq direttament fit-temperatura tat-test. Sussegwentement il-konċentrazzjoni massa tas-sustanza għall-ittestjar fis-soluzzjoni fl-ilma, li m'għandhiex tinkludi xi partiċelli mhux maħlula, tkun iddeterminata b'metodu analitiku li jixraq (3).

Apparat

22. Hemm bżonn il-materjali li ġejjin:

— ħġieġ u strumentazzjoni normali tal-laboratorju;

— apparat għall-aġitazzjoni ta' soluzzjonijiet f'temperatura kostanti kontrollata;

— jekk ikun meħtieġ għal emulsjonijiet, magna ċentrifuga (preferibbilment bit-termostat); u

— apparat analitiku.

Proċedura

23. Il-kwantità ta' sustanza għall-ittestjar neċessarja biex ikun issaturat il-volum mixtieq tal-ilma hija stmata mit-test preliminari. Tintiżen madwar ħames darbiet aktar ta' dik il-kwantità f'kull wieħed mit-tliet reċipjenti tal-ħġieġ mgħammra b'tappijiet tal-ħġieġ (eż. tubi ċentrifuga, fliexken). Jiżdied f'kull reċipjent volum ta' ilma, magħżul skont il-funzjoni tal-metodu analitiku u tal-iskala ta' solubilità. Ir-reċipjenti jingħalqu sew u wara jiġu mċaqalqa fi 30 °C. Għandu jintuża apparat li jċaqlaq jew iħawwad li kapaċi jaħdem f'temperatura kostanti, eż. taħwid manjetiku f'banju tal-ilma bit-termostat. Wara ġurnata, wieħed mir-reċipjenti jitneħħa u jiġi ekwilibrat għal 24 siegħa fit-temperatura tat-test b'ċaqliq okkażżjonali. Il-kontenuti

▼M4

tar-reċipjent imbagħad jiġu ċċentrifugati fit-temperatura tat-test u l-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fil-fażi fl-ilma ċar tkun iddeterminata b'metodu analitiku adattat. Iż-żewġ fliexken l-oħra jkunu ttrattati bl-istess mod wara ekwilibrazzjoni inizjali fi 30 °C għal jumejn u tlett ijiem rispettivament. Jekk ir-riżultati tal-konċentrazzjonijiet mkejla f'mill-anqas l-aħħar żewġ reċipjenti ma jkunux differenti b'aktar minn 15 %, it-test ikun sodisfaċenti. Jekk ir-riżultati mir-reċipjenti 1, 2 u 3 juru tendenza ta' valuri qed jiżdiedu, it-test kollu għandu jkun ripetut bl-użu ta' ħinijiet ta' ekwilibrazzjoni itwal.

24. It-test jista' jitwettaq mingħajr inkubazzjoni minn qabel fi 30 C. Bil-għan li tkun stmata r-rata li biha jkun stabbilit l-ekwilibriju tas-saturazzjoni, jittieħdu kampjuni sakemm il-ħin tat-tħawwid ma jinfluwenzawx aktar il-konċentrazzjonijiet imkejla.

25. Il-pH ta' kull kampjun għandu jitkejjel, preferibbilment bl-użu ta' strixex indikaturi speċjali.

Determinazzjonijiet analitiċi

26. Huwa ppreferut metodu speċifiku għas-sustanza minħabba li ammonti żgħar ta' impuritajiet li jinħallu jistgħu jikkawżaw żbalji kbar fis-solubilità mkejla. Eżempji ta' metodi bħal dawn huma: kromatografija tal-gass jew likwida, titrazzjoni, fotometrija, voltametrija.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

Metodu ta' eluzjoni tal-kolonna

27. Għal kull prova li ssir, għandu jkun ikkalkulat il-valur medju u d-devjazzjoni standard minn mill-anqas ħames kampjuni konsekuttivi meħudin mis-saturazzjoni kostanti. Il-valuri medji miksubin miż-żewġ testijiet bi flussi differenti m'għandhomx ikunu differenti b'aktar minn 30 %.

Metodu tal-flixkun

28. Ir-riżultati individwali għal kull wieħed mit-tliet fliexken, li m'għandhomx ikunu differenti b'aktar minn 15 %, tingħatalhom medja.

Rapport tat-test

Metodu ta' eluzjoni tal-kolonna

29. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— ir-riżultati tat-test preliminari;

— l-identità tal-kimika u l-impuritajiet (stadju preliminari ta' purifikazzjoni, jekk ikun hemm);

— il-konċentrazzjonijiet, rati ta' fluss u l-pH għal kull kampjun;

— id-devjazzjonijiet medji u standard minn mill-anqas ħames kampjuni mis-saturazzjoni kostanti għal kull prova;

— il-medja ta' mill-anqas żewġ provi suċċessivi;

— it-temperatura tal-ilma matul il-proċess ta' saturazzjoni;

— il-metodu ta' analiżi;

— in-natura tal-materjal ta' rfid;

— il-preparazzjoni tal-materjal ta' rfid;

— solvent użat;

— xhieda ta' kwalunkwe instabbiltà kimika tas-sustanza matul it-test;

— l-informazzjoni kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati, b'mod partikolari fir-rigward ta' impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza għall-ittestjar.

▼**M4**

Metodu tal-flixkun

30. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— ir-riżultati tat-test preliminari;

— l-identità tal-kimika u l-impuritajiet (stadju preliminari ta' purifikazzjoni, jekk ikun hemm);

— id-determinazzjonijiet analitiċi individwali u l-medja fejn aktar minn valur wieħed kien iddeterminat għal kull flixkun;

— il-pH ta' kull kampjun;

— il-medja tal-valuri għal fliexken differenti li kienu jaqblu;

— it-temperatura tat-test;

— il-metodu analitiku;

— xhieda ta' kwalunkwe instabbiltà kimika tas-sustanza matul it-test;

— l-informazzjoni kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati, b'mod partikolari fir-rigward ta' impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza għall-ittestjar.

LETTERATURA:

(1) Id-Direttiva tal-Kummissjoni 92/69/KEE tal-31 Lulju 1992 li tadatta għall-progress tekniku għas-sbatax-il darba d-Direttiva 67/548/KEE rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikoluż (ĠU L 383, 29.12.1992, p. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use -Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility - Column elution method. 3)

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

▼B

A.8. KOEFFIĊJENT TAL-QSIM

1. METODU

Il-metodu "taċ-ċaqliq tal-flixkun" imfisser huwa bbażat fuq il-linja gwida tat-Test OECD (1).

1.1. DAĦLA

Biex isir it-test huwa utli li jkollok informazzjoni preliminari dwar il-formula strutturali, il-kostanti ta' dissoċjazzjoni, is-solubiltà ta' l-ilma, l-idrolisi, is-solubiltà ta' l-n-oktanol, it-tensjoni tas-superfiċje tas-sustanza.

Il-kejlijiet għandhom jittieħdu fuq sustanzi jonizzabbli biss fil-forma mhux jonizzata tagħhom (aċidu ħieles jew bażi ħielsa) prodotti bl-użu ta' sustanza adattata b'pH ta' mill-anqas unità pH taħt (aċidu ħieles) jew fuq (bazi ħielsa) il-pK.

Dan il-metodu tat-test jinkludi żewġ proċeduri separati: il-metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun u l-kromatografija likwida ta' rendiment għoli (HPLC). Ta' l-ewwel hija applikabbli meta l-valur tal-log P_{ow} (ara isfel għad-definizzjonijiet) jaqa' fl-iskala minn - 2 sa 4 u ta' l-aħħar fl-iskala minn 0 sa 6. Qabel ma titwettaq xi waħda mill-proċeduri sperimentali għandha l-ewwel tinkiseb stima preliminari tal-koeffiċjent tal-qsim.

Il-metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun japplika biss għal sustanzi essenzjalment puri li jinħallu fl-ilma u fl-n-oktanol. Ma japplikax għall-materjali attivi fuq is-superfiċje (li għalihom għandu jkun provdut valur ikkalkulat jew stima bbażata fuq is-solubilitajiet individwali fl-n-oktanol u l-ilma).

Il-metodu HPLC ma japplikax għall-aċidi u l-bażijiet qawwija, komplessi metalliċi, materjali attivi fuq is-superficje jew sustanzi li jirreaġġixxu ma' l-eluwent. Għal dawn il-materjali, għandu jkun provdut valur ikkalkulat jew stima bbażata fuq is-solubilitajiet individwali fl-n-oktanol u l-ilma.

Il-metodu HPLC huwa inqas sensittiv għall-preżenza ta' impuritajiet fil-kompost għat-test milli huwa l-metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun. Madankollu, f'xi każijietjiet impuritajiet jistgħu jagħmlu l-interpretazzjoni tar-riżultati diffiċli minħabba li l-assenjazzjoni tal-quċċata ssir inċerta. Għal taħlitiet li jagħtu faxxa mhux riżolta, għandhom ikunu ddikjarati l-ogħla u l-inqas limiti tal-log P.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Il-koeffiċjent tal-qsim (P) huwa mfisser bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjonijiet ta' l-ekwilibriju (c_i) tas-sustanza maħlula f'sistema ta' żewġ fażijiet li tikkonsisti f'żewġ solventi li ma jistgħux jitħalltu. Fil-każ ta' l-n-oktanol u l-ilma:

$$p_{ow} = \frac{c_n - \text{octanol}}{c_{water}}$$

Il-koeffiċjent tal-qsim (P) għalhekk huwa l-kwozjent taż-żewġ konċentrazzjonijiet u normalment jingħata fil-forma tal-logaritmu tiegħu sa bażi 10 (log P).

▼B

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

Sustanzi ta' referenza mhumiex meħtieġa li jintużaw fil-każijiet kollha meta tkun qed tiġi investigata sustanza ġdida. Huma għandhom iservu primarjament biex jiċċekkjaw r-rendiment tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu tqabbil ma' riżultati minn metodi oħra.

Metodu HPLC

Bil-għan li d-DATA mkejla għall-HPLC tal-kompost tkun relatata mal-valur P tiegħu, għandu jkun stabbilit graff tal-log P vs DATA kromatografika bl-użu ta' mill-inqas 6 punti ta' referenza. Huwa f'idejn dak li qed juża l-apparat li jagħżel is-sustanzi ta' referenza adattati. Fejn huwa possibli, ta' l-inqas żewġ komposti ta' referenza għandu jkollhom P_{ow} akbar minn dak tas-sustanza għat-test, u P_{ow} ieħor taħt dak tas-sustanza għat-test. Għall-valuri ta' log P inqas minn 4, il-kalibrazzjoni tista' tkun ibbażata fuq DATA miksuba bil-metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun. Għall-valuri ta' log P inqas minn 4, il-kalibrazzjoni tista' tkun ibbażata fuq il-valuri validati tal-letteratura jekk dawn jaqblu mal-valuri kkalkulati. Għal aktar eżattezza, huwa preferibbli li jintgħażlu komposti ta' referenza li huma strutturalment relatati mas-sustanza għat-test.

Listi estensivi ta' log P_{ow} għal bosta gruppi ta' kimiċi huma disponibbli (2)(3). Jekk m'hemmx disponibbli DATA dwar il-koeffiċjenti tal-qsim ta' komposti relatati strutturalment, imbagħad tista' tintuża kalibrazzjoni aktar ġenerali, stabbilita ma' komposti ta' referenza oħra.

Lista ta' sustanzi ta' referenza rakkomandati u l-valuri P_{ow} huma mogħtija fl-Appendiċi 2.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI

1.4.1. **Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun**

Biex ikun iddeterminat il-koeffiċjent tal-qsim, irid jinkiseb ekwilibriju bejn il-komponenti kollha li jagħmlu interazzjoni fis-sistema, u l-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi maħlula fiż-żewġ fażijiet jridu jkunu ddeterminati. Studju tal-letteratura fuq dan is-suġġett jindika li jistgħu jintużaw bosta tekniki differenti biex tiġi solvuta din il-problema, i.e. it-taħlit sewwa taż-żewġ fażijiet segwit bis-separazzoni tagħhom bil-għan li tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni ta' l-ekwilibriju għas-sustanza li tkun qed tiġi eżaminata.

1.4.2. **Metodu HPLC**

L-HPLC jitwettaq fuq kolonni analitiċi ppakkjati b'faži solida disponibbli kummerċjalment li fihom idrokarburi b'katina twila (eż. C_8, C_{18}) kimikament mgħaqqda fuq is-silika. Kimiċi injettati f'kolonna bħal din jimxu magħha b'rati differenti minħabba l-gradi differenti tal-qsim bejn il-faži mobbli u l-faži stazzjonarja idrokarbonika. Taħlitiet ta' kimiċi jitneħħewlhom is-sustanzi fl-ordni ta' l-idrofobiċità tagħhom, l-ewwel il-kimiċi li jinħallu fl-ilma u t-tieni l-kimiċi li jinħallu fiż-żejt, fi proporzjon mal-koeffiċjent tal-qsim idrokarburi-ilma tagħhom. Dan jippermetti li tkun stabbilita r-relazzjoni bejn il-ħin ta' retenzjoni fuq kolonna bħal din (faži bil-kontra) u l-koeffiċjent ta' l-n-oktanol/ilma. Il-koeffiċjent tal-qsim jiġi dedott mill-fattur ta' kapaċità k, mogħti bl-espressjoni:

▼B

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

li fiha, t_r = huwa l-ħin ta' retenzjoni tas-sustanza għat-test, u t_o = il-ħin medju li teħtieġ molekula solventi biex tgħaddi mill-kolonna (ħin mejjet).

Mhumiex meħtieġa metodi analitiċi kwantitattivi u hija neċessarja biss id-determinazzjoni tal-ħin ta' elużjoni.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

1.5.1. **Ripetibilità**

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

Bil-għan li tkun assigurata l-eżattezza tal-koeffiċjent tal-qsim, determinazzjonijiet duplikati jridu jsiru taħt tliet kondizzjonijiet ta' test differenti, fejn il-kwantità tas-sustanza speċifikata kif ukoll il-proporzjon tal-volumi tas-solvent jistgħu jvarjaw. Il-valuri ddeterminati tal-koeffiċjent tal-qsim espressi bħala l-logaritmi komuni tagħhom għandhom jidħlu fil-kamp ta' varjabbiltà ta' ± 0,3 unitajiet logaritmiċi.

Metodu HPLC

Bil-għan li tikber il-fiduċja fil-kejl, jridu jsiru determinazzjonijiet duplikati. Il-valuri ta' log P meħuda minn kejl individwali għandhom jaqgħu fil-kamp ta' varjabbiltà ta' ± 0,1 unitajiet logaritmiċi.

1.5.2. **Sensittività**

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

L-iskala ta' kejl tal-metodu hija ddeterminata bil-limitu ta' tfittxija tal-proċedura analitika. Dan għandu jippermetti l-valutazzjoni tal-valuri ta' log P_{ow} fil-kamp ta' varjabbiltà ta' - 2 sa 4 (f'okkażżjonijiet meta kondizzjonijiet japplikaw, dan il-kamp ta' varjabbiltà jista' jitkabbar għall-log P_{ow} sa 5) meta l-konċentrazzjoni ta' sustanza maħlula f'xi waħda mill-fażijiet mhijiex aktar minn 0,01 mol għal kull litru.

Metodu HPLC

Il-metodu HPLC jippermetti koeffiċjenti tal-qsim li jkun stmat fil-log P_{ow} fil-kamp ta' varjabbiltà minn 0 sa 6.

Normalment, il-koeffiċjent tal-qsim ta' kompost jista' jkun stmat sa ± 1 unità logaritmika tal-valur taċ-ċaqliq tal-flixkun. Korrelazzjonijiet tipiċi jistgħu jinstabu fil-letteratura (4)(5)(6)(7)(8). Eżattezza ogħla s-soltu tista' tinkiseb meta grafiċi ta' korrelazzjoni huma bbażati fuq komposti ta' referenza ta' struttura simili (9).

▼B

1.5.3. **Speċifiċità**

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

Il-Liġi tal-Qsim ta' Nernst tapplika biss għal soluzzjonijiet dilwiti f'temperatura, pressjoni u pH kostanti. Hija tapplika strettament għal sustanza pura mxerrda bejn żewġ solventi puri. Jekk bosta sustanzi differenti maħlula jseħħu f'fażi waħda miż-żewġ fażijiet jew fiż-żewġ fażijiet fl-istess ħin, ir-riżultati jistgħu jiġu affettwati.

Dissoċjazzjoni jew assoċjazzjoni tal-molekuli maħlula tirriżulta f'devjazzjonijiet mill-Liġi tal-Qsim ta' Nernst. Devjazzjonijiet bħal dawn huma indikati mill-fatt li l-koeffiċjent tal-qsim isir dipendenti fuq il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni.

Minħabba l-ekwilibriji multipli li huma mdaħħla, dan il-metodu ta' test m'għandux ikun applikat għal komposti jonizzati mingħajr ma tkun applikata korrezzjoni. L-użu ta' sustanza ta' protezzjoni flok l-ilma għandu jkun ikkunsidrat għal komposti bħal dawn; il-pH ta' protezzjoni għandu jkun ta' l-inqas unità ta' 1 pH mill-pKa tas-sustanza u tingħata attenzjoni għar-relevanza ta' dan il-pH għall-ambjent.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Stima preliminari tal-koeffiċjent tal-qsim**

Il-koeffiċjent tal-qsim jiġi stmat preferibbilment bl-użu ta' metodu ta' kalkolu (ara Appendiċi 1), jew fejn adattat, mill-proporzjon tas-solubilitajiet tas-sustanza għat-test fis-solventi puri (10).

1.6.2. **Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun**

1.6.2.1. *Preparazzjoni*

n-Oktanol: Id-determinazzjoni tal-koeffiċjent tal-qsim għandha ssir b'rijaġent ta' analiżi ta' purità għolja.

Ilma: ilma distillat jew li kien distillat għal darbtejn f'apparat tal-ħġieġ jew kwarz għandu jintuża. Għal komposti jonizzati, soluzzjonijiet ta' protezzjoni flok l-ilma għandhom jintużaw jekk possibbli.

Nota:

M'għandux jintuża ilma direttament minn apparat li jbiddel il-jone.

1.6.2.1.1. Pre-saturazzjoni tas-solventi

Qabel ma koeffiċjent tal-qsim jiġi ddeterminat, il-fażijiet tas-sistema tas-solvent jiġu reċiprokament saturati biċ-ċaqliq fit-temperatura ta' l-esperiment. Biex isir dan, hija ħaġa prattika li ċċaqlaq żewġt ifliexken kbar bl-n-oktanol jew bl-ilma t-tnejn ta' purezza għolja bi kwantità suffiċjenti tas-solvent l-ieħor fuq xejker mekkaniku għal 24 siegħa u mbagħad jitħallew joqgħodu għal ħin twil biżżejjed li jippermetti li l-fażijiet jisseparaw u jiksbu stat ta' saturazzjoni.

▼B

1.6.2.1.2. Preparazzjoni għat-test

Il-volum sħiħ tas-sistema b'żewġ fażijiet kważi jimla' r-reċipjent tat-test. Dan jgħin biex jevita telf ta' materjali minħabba volatilizzazzjoni. Il-proporzjon tal-volum u l-kwantitajiet tas-sustanza li għandha tintuża huma stabbiliti f'dawn li ġejjin:

— il-valutazzjoni preliminari tal-koeffiċjent tal-qsim (ara hawn fuq),

— il-kwantità minima tas-sustanza għat-test meħtieġa għall-proċedura analitika, u

— l-limitazzjoni tal-konċentrazzjoni massima għal kull fażi ta' 0,01 mol għal kull litru.

Isiru t-tliet testijiet. F' ta' l-ewwel, tintuża l-proporzjon ta' volum ikkalkulata ta' n-oktanol għall-ilma; fit-tieni, din il-proporzjon tinqasam fi tnejn; u fit-tielet, din il-proporzjon tiġi mmultiplikat bi tnejn (eż. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Is-sustanza għat-test

Titħejja soluzzjoni ta' riżerva f'n-oktanol pre-saturat fl-ilma. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ta' riżerva għandha tkun iddeterminata bi preċiżjoni qabel ma tintuża fid-determinazzjoni tal-koeffiċjent tal-qsim. Is-soluzzjoni għandha tinħażen taħt kondizzjonijiet li jiżguraw l-istabbiltà tagħha.

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

It-temperatura tat-test għandha tinżamm kostanti (± 1 °C) u fil-kamp ta' varjabbiltà ta' 20 sa 25 °C.

1.6.2.3. *Proċedura tal-kejl*

1.6.2.3.1. Kisba ta' l-ekwilibriju tal-qsim

Għal kull kondizzjoni tat-test għandhom jitħejjew reċipjenti tat-test doppji li jkun fihom l-ammonti meħtieġa, taż-żewġ solventi flimkien imkejla b'eżattezza bil-kwantità neċessarja ta' soluzzjoni ta' riżerva.

Il-fażijiet ta' l-n-oktanol għandhom jitkejlu bil-volum. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jew jitpoġġew f'xejkher adattat jew jiċċaqalqu manwalment. Fejn jintuża tubu ċentrifugu, metodu rakkomandat huwa li t-tubu jiddawwar malajr 180° madwar l-assi trasversali tiegħu sabiex kwalunkwe arja maqbuda titla' miż-żewġ fażijiet. L-esperjenza wriet li 50 dawra bħal din is-soltu huma suffiċjenti għall-kisba ta' l-ekwilibriju tal-qsim. Għaċ-ċertezza, huma rakkomandati 100 dawra f'ħames minuti.

1.6.2.3.2. Separazzjoni tal-fażi

Meta huwa neċessarju, bil-għan li jkunu separati l-fażijiet, għandha titwettaq ċentrifugazzjoni tat-taħlita. Dan għandu jsir fiċ-ċentrifugu tal-laboratorju miżmum f'temperatura ambjentali, jew, jekk jintuża ċentrifugu mhux kontrollat permezz tat-temperatura, it-tubi taċ-ċentrifugu għandhom jinżammu għall-ekwilibrazzjoni fit-temperatura tat-test għall-millanqas siegħa qabel l-analiżi.

▼B

1.6.2.4. *Analiżi*

Għad-determinazzjon tal-koeffiċjent tal-qsim, huwa neċessarju li jkunu determinati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza għat-test fiż-żewġ fażijiet. Dan jista' jsir billi tittieħed alikwota ta' kull wieħed miż-żewġ fażijiet minn kull tubu għal kull kondizzjoni ta' test u tiġi analizzata bil-proċedura magħżula. Il-kwantità totali ta' sustanza preżenti fiż-żewġ fażijiet għandha tkun ikkalkulata u mqabbla mal-kwantità tas-sustanza introdotta oriġinarjament.

Għandu jittieħed kampjun tal-faži fl-ilma bi proċedura li timminimizza r-riskju li jkunu introdotti traċċi ta' n-oktanol. Tista' tintuża siringa tal-ħġieġ b'labbra li tista' tintrema biex jittieħed kampjun tal-faži ta' l-ilma. Inizjalment is-siringa għandha tkun parzjalment mimlija bl-arja. L-ajra għandha titneħħa bil-mod waqt li tkun qed tiddaħħal is-siringa fis-saff ta' l-n-oktanol. Volum adattat tal-faži fl-ilma jinġibed fis-siringa. Is-siringa titneħħa malajr mis-soluzzjoni u l-labbra maqlugħa. Il-kontenut tas-siringa jista' mbagħad jintuża bħala kampjun fl-ilma. Il-konċentrazzjoni fiż-żewġ fażijiet separati għandha preferibbilment tkun iddeterminata minn metodu speċifiku għas-sustanza. Eżempji ta' metodi analitiċi li jistgħu jkunu adattati huma:

— il-metodi fotometriċi,

— il-kromatografija tal-gass,

— il-kromatogrfija likwida ta' rendiment għoli.

1.6.3. **Metodu HPLC**

1.6.3.1. *Preparazzjoni*

Apparat

Huwa meħtieġ kromatografu likwidu, mgħammar b'pompa mingħajr vibrazzjoni u apparat ta' osservazzjoni adattat. Huwa rakkomandat li jintuża valv ta' injezzjoni b'ċirku ta' injezzjoni. Il-preżenza ta' gruppi polari fil-faži stazzjonarja tista' tfixkel serjament il-prestazzjoni tal-kolonna HPLC. Għalhekk, fażijiet stazzjonarji għandhom ikollhom il-perċentwali minima tal-gruppi polari (11). Jista' jintuża ppakkjar kummerċjali ta' mikropartikulati b'faži b'lura jew kolonni diġà ppakkjati. Kolonna ta' protezzjoni tista' titpoġġa bejn is-sistema ta' injezzjoni u l-kolonna analitika.

Faži mobbli

Biex jitħejja s-solvent ta' elużjoni jintużaw metanol iggradat għall-HPLC jew ilma ggradat għall-HPLC u s-solvent jitneħħilu l-gass qabel l-użu. Għandha tintuża elużjoni isokratika. Għandhom jintużaw proporzjonijiet ta' metanol/ilma b'kontenut minimu ta' ilma ta' 25 %. Tipikament taħlita ta' 3:1 (v/v) metanol-ilma hija sodisfaċenti għall-elużjoni ta' komposti ta' log P 6 fi żmien siegħa, b'rata ta' fluss ta' 1 ml/min. Għal komposti ta' log P għoli jista' jkun neċessarju li jitqas-srilhom iż-żmien ta' l-elużjoni (u dak tal-komposti ta' referenza) billi titnaqqas il-polarità tal-faži mobbli jew it-tul tal-kolonna.

Sustanzi b'solubiltà baxxa ħafna f'n-oktanol għandhom tendenza li jagħtu valuri ta' log P_{ow} baxxi u mhux normali bil-metodu HPLC; il-quċċata ta' komposti bħal dawn xi drabi takkumpanja l-front tas-solvent. Dan probabbilment huwa minħabba l-fatt li l-proċess tal-qsim huwa bilmod wisq biex jintlaħaq ekwilibriju fiż–żmien normalment meħtieġ għal separazzjoni HPLC. It-tnaqqis tar-rata tal-fluss u/jew it-tbaxxija tal-proporzjon metanol/ilma tista'/jistgħu mbagħad tkun/ikunu effettivi biex jinkiseb valur affidabbli.

▼B

Il-komposti għat-test u ta' referenza għandhom ikunu solubbli fil-fażi mobbli f'konċentrazzjonijiet suffiċjenti li jippermettu l-osservazzjoni tagħhom. F'każijiet eċċezzjonali biss jistgħu jintużaw additivi mat-taħlita metanol/ilma, għaliex l-additivi jibdlu l-proprjetajiet tal-kolonna. Għal kromatogrammi b'additivi huwa obbligatorju li tintuża kolonna separata ta' l-istess tip. Jekk il-metanol/ilma mhuwiex adattat, taħlitiet oħra ta' solvent organiku-ilma jistgħu jintużaw, eż. etanol-ilma jew *acetonitrile*-ilma.

Il-pH ta' l-eluwent huwa kritiku għal komposti jonizzabbli. Huwa għandu jkun fl-iskala operattiva tal-pH tal-kolonna, li s-soltu hija bejn 2 u 8. Hija rakkomandata protezzjoni. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat il-preċipitazzjoni tal-melħ u t-taħsir tal-kolonna li jseħħu b'xi taħlitiet ta' fażi organika/ta, protezzjoni. Kejl HPLC b'fażijiet stazzjonarji bbażati fuq is-silika 'l fuq minn pH8 mhuwiex rakkomandat għaliex l-użu ta' fażi alkalina, mobbli tista' tikkawża nuqqas rapidu ta' prestazzjoni tal-kolonna.

Sustanzi maħlula

Il-komposti ta' referenza għandhom ikunu fil-forma l-aktar pura disponibbli. Komposti li se jiġu użati għal skopijiet ta' test jew ta' kalibrazzjoni jiġu maħlula jekk huwa possibli fil-fażi mobbli.

Kondizzjonijiet tat-test

It-temperatura matul il-kejl m'għandhiex tvarja b'aktar minn ± 2 K.

1.6.3.2. ***Kejl***

Kalkolu tal-ħin mejjet t_o

Il-ħin mejjet t_o jista' jkun iddeterminat bl-użu jew ta' serje omologa (eż. *n-alkyl methyl ketones*) jew mill-komposti organiċi mhux miżmuma (eż. *thiourea* jew *formamide*). Għal kalkolu tal-ħin mejjet t_o bl-użu tas-serje omologa, sett ta' mill-anqas seba' membri tas-serje omologa jiġi injettat u ż-żmien ta' retenzjoni rispettivament jiġi ddeterminat. Il-ħinijiet ta' retenzjoni mhux analizzati $t_{r\ (n\ c\ +\ 1)}$ jiġu pplottjati bħala funzjoni ta' $t_{r(n\ c)}$ u l-linja bejn żewġ punti ta' interċezzjoni a u l-anglu b ta' l-ekwazzjoni ta' regressjoni:

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

jiġu ddeterminati (n_c = n-numru ta' l-atomi tal-karbonju). Il-ħin mejjet t_o mbagħad huwa mogħti bi:

$$t_o = a/(1-b)$$

▼B

Graff ta' kalibrazzjoni

Il-pass li jmiss huwa li tinbena plott ta' korrelazzjoni tal-valuri log k kontra log p għall-komposti ta' referenza adattati. Fil-prattika, sett ta' bejn 5 u 10 komposti ta' referenza standard li l-log p tagħhom hija madwar l-iskala mistennija jiġu injettati flimkien u jiġu ddeterminati l-ħinijiet ta' retenzjoni, preferibbilment fuq integratur ta' l-irrekordjar mgħaqqad mas-sistema tat-tiftix. Il-logaritmi korrispondenti tal-fatturi ta' kapaċità, log k, huma kkalkulati u pplottjati bħala funzjoni tal-log p ddeterminat bil-metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun. Il-kalibrazzjoni titwettaq f'intervalli regolari, għall-inqas darba kuljum, sabiex ikunu jistgħu jiġu kkunsidrati l-bidliet possibbli fil-prestazzjoni tal-kolonna.

Determinazzjoni tal-fattur tal-kapaċità tas-sustanza għat-test

Is-sustanza għat-test tiġi injettata fi kwantità żgħira kemm jista' jkun ta' faża mobbli. Il-ħin ta' retenzjoni jiġi ddeterminat (għal darbtejn), u b'hekk jippermetti l-kalkolu tal-fattur ta' kapaċità k. Mill-graff tal-korrelazzjoni tal-komposti ta' referenza, il-koeffiċjent tas-sustanza għat-test jista' jiġi interpolat. Għal koeffiċjenti baxxi ħafna u għolja ħafna, hija neċessarja l-estrapolazzjoni. F'dawk il-każijiet trid tingħata attenzjoni partikulari għal-limiti ta' validità tal-linja ta' rigressjoni.

2. **DATA**

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

L-affidabbiltà tal-valuri ddeterminati ta' P jistgħu jkunu ppruvati bi tqabbil mal-mezzi tad-determinazzjonijiet dupplikati mal-medja globali.

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet),

— meta l-metodi ma japplikawx (eż. materjal attiv fuq is-superfiċje), għandhom ikun pprovdut valur ikkalkulat jew stima bbażat/a fuq is-solubilitajiet individwali fl-n-oktanol u fl-ilma,

— l-informazzjoni u r-rimarki kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rrapportati, b'mod speċjali fir-rigward ta' l-impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

Għall-metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun:

— ir-riżultat ta' l-istima preliminari, jekk ikun hemm,

— it-temperatura tad-determinazzjoni,

— id-DATA dwar il-proċeduri analitiċi użati fid-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet,

— il-ħin u l-veloċità taċ-ċentrifugazzjoni, jekk użata,

▼B

— il-konċentrazzjonijiet imkejla biż-żewġ fażijiet għal kull determinazzjoni (dan ifisser li total ta' 12-il konċentrazzjoni jiġu rrappurtati),

— il-piż tas-sustanza għat-test, il-volum ta' kull faži użata f'kull reċipjent tat-test u l-ammont totali kkalkulat ta' sustanza għat-test preżenti f'kull faži wara l-ekwilibrazzjoni,

— il-valuri kkalkulati tal-koeffiċjent tal-qsim (P) u l-medja għandhom ikunu rrapurtati għal kull sett ta' kondizzjonijiet tat-test kif għandu jsir ukoll għall-medja tad-determinazzjonijiet kollha. Jekk hemm suspett ta' dipendenza tal-konċentrazzjoni fuq il-koeffiċjent tal-qsim, dan għandu jkun imniżżel fir-rapport,

— id-devjazzjoni standard tal-valuri individwali P madwar il-medja tagħhom għandha tkun rrapurtata,

— il-valur medju P tad-determinazzjonijiet kollha għandu jkun espress ukoll bħala logartimu tiegħu stess (bażi 10),

— il-P_{ow} teoretiku kkalkulat meta dan il-valur ġie ddeterminat jew meta l-valur imkejjel huwa > 10^4,

— il-pH ta' l-ilma użat u tal-faži fl-ilma matul l-esperiment,

— jekk jintużaw protezzjonijiet, ġustifikazzjoni għall-użu tal-protezzjonijiet flok l-ilma, il-kompożizzjoni, il-konċentrazzjoni u l-pH tal-protezzjonijiet, il-pH tal-faži fl-ilma qabel u wara l-esperiment.

Metodu HPLC:

— ir-riżultat ta' l-istima preliminari, jekk ikun hemm,

— is-sustanza għat-test u ta' referenza u l-purità tagħhom,

— l-iskala tat-temperatura tad-determinazzjonijiet,

— il-pH li fih isiru d-determinazzjonijiet,

— id-dettalji tal-kolonna analitika u ta' protezzjoni, tal-faži mobbli u tal-mezzi tat-tiftix,

— id-DATA ta' retenzjoni u l-valuri tal-log P fil-letteratura għall-komposti ta' referenza użati fil-kalibrazzjoni,

— id-dettalji tal-linja ta' rigressjoni riżultanti (log K kontra log P),

— id-DATA ta' retenzjoni medja u l-valur interpolat ta' log P għall-kompost għat-test,

— id-deskrizzjoni tat-tagħmir u l-kondizzjonijiet operattivi,

— il-profili ta' l-elużjoni,

— il-kwantitajiet ta' sustanzi għat-test u ta' referenza mdaħħla fil-kolonna,

— il-ħin mejjet u kif tkejjel.

▼B

4. **REFERENZI**

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

(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

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

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

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

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

▼B

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

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base11978.

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

▼B

Appendiċi 1

Metodi ta' stima/kalkolu

DAĦLA

Daħla ġenerali għall-metodi ta' kalkolu, DATA u eżempji huma pprovduti fil-*Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a).

Il-valuri kkalkulati tal-P_{ow} jistgħu jintużaw:

— biex ikun deċiż liema mill-metodi sperimentali huma adattati (skala taċ-ċaqliq tal-flixkun: log P_{ow}: minn - 2 sa 4, skala HPLC: log P_{ow}: minn 0 sa 6),

— għall-għażla tal-kondizzjonijiet għat-test adattati (eż. sustanzi ta' referenza għal proċeduri HPLC, proporzjon tal-volum n-oktanol/ilma għall-metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun),

— bħala verifika interna tal-laboratorju ta' żbalji sperimentali possibli,

— għall-għoti ta' stima ta' P_{ow}- f'każijiet fejn il-metodi sperimentali ma jistgħux jiġu applikati għal raġunijiet tekniċi.

METODU TA' STIMA

Stima preliminari tal-koeffiċjent tal-qsim

Il-valur tal-koeffiċjent tal-qsim jista' jkun stmat bl-użu tas-solubilitajiet tas-sustanza tat-test f'solventi puri: Għal din:

$$P_{stmat} = \frac{\text{saturazzjoni } c_{n-\text{oktanol}}}{\text{saturazzjoni c}}$$

METODI TA' KALKOLU

Prinċipju tal-Metodi ta' Kalkolu

Il-metodi kollha ta' kalkolu huma bbażati fuq il-frammentazzjoni formali tal-molekula b'sub-strutturi adattati li għalihom huma magħrufa żidiet affidabbli tal-log P_{ow}. Il-log P_{ow} tal-molekula kollha huwa mbagħad ikkalkulat bħala s-somma tal-valur tal-framment korrispondenti tiegħu flimkien mas-somma tat-termini ta' korrezzjoni għal interazzjonijiet intramolekulari.

Lista ta' kostanti ta' frammenti u termini ta' korrezzjoni huma disponibbli (b)(c)(d)(e);. Uħud huma regolarment aġġornati (b).

Kriterji ta' kwalità

B'mod ġenerali, l-affidabbiltà tal-metodu ta' kalkolu tonqos jekk tiżdied il-komplessità tal-kompost taħt studju. Fil-każ ta' molekuli sempliċi b'piż molekulari baxx u grupp funzjonali jew tnejn, tista' tkun mistennija devjazzjoni ta' 0,1 sa 0,3 unitajiet ta' log P_{ow} bejn ir-riżultati tal-metodi ta' frammentazzjoni differenti u l-valur mkejjel. Fil-każ ta' molekuli aktar komplessi l-marġni ta' l-iżball jista' jkun akbar. Dan se jiddependi fuq l-affidabbiltà u d-disponibbiltà ta' kostanti ta' framment, kif ukoll fuq l-abbiltà biex jintgħarfu l-interazzjonijeit intramolekulari (eż.. ir-rabtiet ta' l-idroġenu) u l-użu korrett tat-termini ta' korrezzjoni (inqas ta' problema bis-software tal-kompjuter CLOGP-3) (b). Fil-każ ta' komposti jonizzanti l-konsiderazzjoni korretta taċ-ċarġ u l-grad ta' jonizzazzjoni hija importanti.

▼B

Proċedura ta' kalkolu

Il-metodu Hansch π-

Il-kostanti tas-sostitwent idrofobiku oriġinali, π, introdott minn Fujira et al. (f) huwa mfisser bħala:

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

fejn P_{ow} (PhX) huwa l-koeffiċjent tal-qsim ta' derivattiv aromatiku u P_{ow} (PhH) dak tal-kompost ewlieni

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

Skond id-definizzjoni tiegħu l-metodu π japplika b'mod predominanti għal sostituzzjoni aromatika. Valuri π għal għadd kbir ta' sostitwenti ngħataw f'tabelli (b)(c)(d). Huma użati għall-kalkolu ta' log P_{ow} għall-molekuli jew substrutturi aromatiċi.

Metodu Rekker

Skond Rekker (g) il-valur tal-log P_{ow} huwa kkalkulat kif ġej:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{termini ta' interazzjoni}).$$

fejn f_i jirrappreżenta l-kostanti tal-frammenti molekulari differenti u a_i il-frekwenza ta' l-okkorrenza fil-molekula taħt eżami. It-termini ta' korrezzjoni jistgħu jiġu espressi bħala multiplu integrali ta' kostanti wieħed C_m (l-hekk imsejjaħ "kostanti maġiku"). Il-kostanti tal-frammenti f_i u C_m kienu ddeterminati minn lista ta' 1,054 valur sperimentali ta' P_{ow} (825 kompost) bl-użu ta' l-analiżi ta' rigressjoni multipla (c)(h). Id-determinazzjoni tat-termini ta' interazzjoni titwettaq skond regoli fissi mfissra fil-letteratura (e)(h)(i).

Il-metodu Hansch-Leo

Skond Hansch u Leo (c) il-valur tal-log P_{ow} huwa kkalkulat kif ġej:

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

fejn f_i jirrapreżenta l-kostanti tal-frammenti molekulari differenti, F_j it-termini ta' korrezzjoni u a_i il-frekwenzi korrispondenti ta' l-okkorrenza. Lista ta' valuri atomiċi u ta' gruppi frammentali u lista ta' termini ta' korrezzjoni F_j (l-hekk imsejħa "fatturi") iddeterminati bl-approssimazzjoni, inkisbet mill-valuri sperimentali $P_{ow.}$ It-termini ta' korrezzjoni kienu ordnati f'diversi klassijiet differenti (a)(c). Huwa relattivament komplikat u jitteħed wisq ħin biex ikunu kkunsidrati r-regoli u t-termini ta' korrezzjoni kollha. Pakketti tas-software ġew żviluppati (b).

Metodu Kombinat

Il-kalkolu tal-log P_{ow} tal-molekuli komplessi tista' titjieb konsiderevolment, jekk il-molekula tiġi tinqasam f'substrutturi akbar li għalihom hemm disponibbli valuri affidabbli tal-log P_{ow} jew mit-tabelli (b)(c) jew mill-kejl li wieħed jagħmel. Frammenti bħal dawn (eż.. eteroċikli, antrakinone,ażobenżin) jistgħu mbagħad jiġu kkombinati mal-valuri Hansch π jew mal-kostanti tal-frammenti Rekker jew Leo.

Rimarki

i) Il-metodi ta' kalkolu jistgħu jkunu applikati biss għal komposti jonizzati parzjalment jew sħaħ meta huwa possibli li jiġu kkunsidrati l-fatturi ta' korrezzjoni neċessarji.

▼B

ii) Jekk wieħed jassumi li hemm rabtiet idroġeni intramolekulari, it-termini ta' korrezzjoni korrispondenti (approssimattivament unitajiet + 0,6 to + 1,0 log P_{ow}) jridu jiġu miżjuda (a). Indikazzjoni tal-preżenza ta' rabtiet bħal dawn jistgħu jinkisbu mill-mudelli tridimensjonali jew mid-DATA spettroskopika tal-molekula.

iii) Jekk huma possibli bosta forom tawtomeriċi, l-aktar forma probabbli għandha tintuża bħala bażi għall-kalkolu.

iv) Ir-reviżjonijiet tal-listi tal-kostanti tal-frammenti għandhom jkunu segwiti bl-attenzjoni kollha.

Rapport

Meta jkunu qed jintużaw metodi ta' kalkolu/stima, ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— id-deskrizzjoni tas-sustanza (identità, impuritajiet, eċċ.),

— l-indikazzjoni ta' kwalunkwe rabta idroġena intramolekulari possibli, dissoċjazzjoni, taċ-ċarġ u kwalunkwe effett mhux tas-soltu ieħor (eż.. tawtomeriżmu),

— id-deskrizzjoni tal-metodu ta' kalkolu,

— l-identifikazzjoni jew il-provvista ta' *database*,

— il-pekularitajiet fil-għażla tal-frammenti,

— id-dokumentazzjoni komprensiva tal-kalkolu.

LETTERATURA

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

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

(ċ) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

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

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

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

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

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

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

▼B

Appendici 2

Sustanzi ta' Referenza Rakkomandati għal Metodu HPLC

No.	Reference Substance	log P_{ow}	pKa
1	2-Butanone	0,3	
2	4-Acetylpyridine	0,5	
3	Aniline	0,9	
4	Acetanilide	1,0	
5	Benzylalcohol	1,1	
6	p-Methoxyphenol	1,3	pKa = 10,26
7	Phenoxy acetic acid	1,4	pKa = 3,12
8	Phenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrophenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitrile	1,6	
11	Phenylacetonitrile	1,6	
12	4-Methylbenzyl alcohol	1,6	
13	Acetophenone	1,7	
14	2-Nitrophenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzoic acid	1,8	pKa = 3,47
16	4-Chloraniline	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzene	1,9	
18	Cinnamic alcohol	1,9	
19	Benzoic acid	1,9	pKa = 4,19
20	p-Cresol	1,9	pKa = 10,17
21	Cinnamic acid	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisole	2,1	
23	Methylbenzoate	2,1	
24	Benzene	2,1	
25	3-Methylbenzoic acid	2,4	pKa = 4,27
26	4-Chlorophenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trichloroethylene	2,4	
28	Atrazine	2,6	
29	Ethylbenzoate	2,6	
30	2,6-Dichlorobenzonitrile	2,6	
31	3-Chlorobenzoic acid	2,7	pKa = 3,82
32	Toluene	2,7	
33	1-Naphthol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dichloroaniline	2,8	
35	Chlorobenzene	2,8	
36	Allyl-phenylether	2,9	
37	Bromobenzene	3,0	

▼B

No.	Reference Substance	log P_{ow}	pKa
38	Ethylbenzene	3,2	
39	Benzophenone	3,2	
40	4-Phenylphenol	3,2	pKa = 9,54
41	Thymol	3,3	
42	1,4-Dichlorobenzene	3,4	
43	Diphenylamine	3,4	pKa = 0,79
44	Naphthalene	3,6	
45	Phenylbenzoate	3,6	
46	Isopropylbenzene	3,7	
47	2,4,6-Trichlorophenol	3,7	pKa = 6
48	Biphenyl	4,0	
49	Benzylbenzoate	4,0	
50	2,4-Dinitro-6 sec. butyophenol	4,1	
51	1,2,4-Trichlorobenzene	4,2	
52	Dodecanoic acid	4,2	
53	Diphenylether	4,2	
54	n-Butylbenzene	4,5	
55	Phenanthrene	4,5	
56	Fluoranthene	4,7	
57	Dibenzyl	4,8	
58	2,6-Diphenylpyridine	4,9	
59	Triphenylamine	5,7	
60	DDT	6,2	
	Other reference substances of low log P_{ow}		
1	Nicotinic acid	- 0,07	

▼B

A.9. IL-PUNT TA' FJAMMABILITÀ

1. METODU

1.1. DAĦLA

Huwa utli li jkun hemm informazzjoni preliminari dwar il-fjammabilità tas-sustanza qabel jitwettaq dan it-test. Il-proċedura tat-test hija applikabbli għas-sustanzi likwidi fejn il-fwar jista' jitqabbad permezz ta' għejun ta' fjammabilità tan-nar. Il-metodi tat-test mniżżla f'dan it-test huma biss affidabbli għall-iskala ta' punti ta' fjammabilità li huma speċifikati fil-metodi individwali.

Il-possibiltà ta' reazzjonijiet kimiċi bejn is-sustanza u fejn jinżamm il-kampjun għandha tkun ikkunsidrata meta jintgħażel il-metodu li se jintuża.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Il-punt ta' infjammabilità huwa l-inqas temperatura, korretta għal pressjoni ta' 101,325 kPa, li fiha likwidu jevolvi l-fwar, taħt kondizzjonijiet imfissra fil-metodu tat-test, f'dak l-ammont li l-fwar fjammabbli/t-taħlita ta' arja huwa/hija prodott/a fir-reċipjent tat-test.

Unitajiet: °C

$t = T - 273,15$

(t f' ^{o}C u T f'K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza mhumiex meħtieġa li jintużaw fil-każijiet kollha meta tkun qed tiġi investigata sustanza ġdida. Huma għandhom iservu primarjament biex jiċċekkjaw ir-rendiment tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu tqabbil ma' riżultati minn metodi oħra.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI

Is-sustanza titpoġġa fir-reċipjent tat-test u tissaħħan jew titkessaħ sat-temperatura tat-test skond il-proċedura mfissra fil-metodu tat-test individwali. Testijiet dwar il-fjammabilità jitwettqu bil-għan li jkun aċċertat jekk il-kampjun qabadx jew le fit-temperatura tat-test.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

1.5.1. **Ripetibbilità**

Ir-ripetibbilità tvarja skond l-iskala tal-fjammabilità u l-metodu tat-test użat; sa massimu ta' 2 ^{o}C.

1.5.2. **Sensittività**

Is-sensittività tiddependi fuq il-metodu tat-test użat.

1.5.3. **Speċifiċità**

L-ispeċifiċità ta' wħud mill-metodi tat-test hija limitata għal ċerti skali ta' punti ta' fjammabilità u suġġetti għal DATA relatata mas-sustanza (eż. viskożità għolja).

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Preparazzjonijiet**

Kampjun tas-sustanza għat-test jitpoġġa f'apparat għat-test skond 1.6.3.1 u/jew 1.6.3.2.

Għas-sikurezza, huwa rakkomandat li metodu li jutilizza daqs żgħir ta' kampjun, circa 2 cm^3, jintuża għal sustanzi enerġetiċi jew tossiċi.

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

L-apparat, għandu, sakemm ikun konsistenti mas-sikurezza, jitpoġġa f'pożizzjoni 'l-boghod mill-kurrent ta' l-arja.

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

1.6.3.1. *Metodu ta' l-ekwilibriju*

Ara ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Metodu ta' non-ekwilibriju*

Apparat Abel:

Ara BS 2000 parti 170, NF M07-011, NF T66-009.

Apparat Abel-Pensky:

Ara EN 57, DIN 51755 parti 1 (għal temperaturi minn 5 sa 65 °C), DIN 51755 parti 2 (għal temperaturi taħt il-5 C), NF M07-036.

Apparat Tag:

Ara ASTM D 56.

Apparat Pensky-Martens:

Ara ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Rimarki:

Meta l-punt ta' fjammabilità, iddeterminat permezz ta' metodu ta' non-ekwlibriju f'1.6.3.2., jinstab li huwa 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C jew 55 ± 2 °C, għandu jkun ikkonfermat b'metodu ta' ekwilibriju bl-użu ta' l-istess apparat.

Il-metodi li jagħtu t-temperatura tal-punt ta' fjammabilità biss jistgħu jintużaw għal notifikazzjoni.

Biex ikun iddeterminat il-punt ta' fjammabilità ta' likwidi viskoži (żebgħa, gomom u simili) li fihom solventi, jista' jintuża biss apparat u jintużaw biss metodi tat-test adattati għad-determinazzjoni tal-punt ta' fjammabilità ta' likwidi viskoži.

Ara ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 parti 1.

▼B

2. **DATA**

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet),

— il-metodu użat għandu jkun dikjarat kif ukoll xi devjazzjonijiet possibbli,

— ir-riżultati u xi rimarki addizzjonali relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

Xejn.

▼B

A.10. **FJAMMABILITÀ (SOLIDI)**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

Huwa utli li jkun hemm informazzjoni preliminari dwar proprjetajiet splussivi potenzjali tas-sustanza qabel jitwettaq dan it-test.

Dan it-test għandu jkun applikat biss għal sustanzi tat-trab, mrammla jew qishom kolla.

Bil-għan li ma jiġux inklużi s-sustanzi kollha li jistgħu jinxtegħlu imma dawk biss li jinħarqu malajr jew dawk li l-imġiba tal-ħruq tagħhom hija fi kwalunkwe mod speċjalment perikoluża, sustanzi li l-veloċità tal-ħruq tagħhom taqbeż ċertu valur ta' limitu biss huma kkunsidrati bħala fjammabbli ħafna.

B'mod speċjali jista' jkun perikolużi li inkandexxenza timxi permezz ta' trab metalliku minħabba d-diffikultajiet fit-tifi ta' nar. Trabijiet metalliċi għandhom ikunu kkunsidrati bħala fjammabli ħafna jekk huma jgħinu t-tixrid ta' l-inkandexxenza fil-piż fi żmien speċifikat.

1.2. TIFSIRA U UNITAJIET

Il-ħin tal-ħruq huwa muri f'sekondi.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.4. PRINĊIPJU TAL-METOD

Is-sustanza tiġi ffurmata fi strixxa mhix maqtugħa jew miċċa tat-trab ta' madwar 250 mm tul u test preliminari ta' orjentazzjoni jiġi esegwit biex ikun iddeterminat jekk, mal-fjammabilità ta' fjamma tal-gass, issirx propagazzjoni bil-ħruq tal-fjamma jew bi ħruq bati mingħajr fjamma. Jekk isseħħ propagazzjoni fuq 200 mm tal-miċċa f'ħin speċifikat allura jitwettaq programm ta' test sħiħ biex tkun iddeterminata r-rata ta' ħruq.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Test preliminari ta' orjentazzjoni**

Is-sustanza tiġi ffurmata fi strixxa mhux miksura jew miċċa tat-trab madwar 250 mm tul u 20 mm wiesa' b'10 mm għoli fuq pjanċa tal-bażi mhux kombustibbli, mhux poruża u b'konduċibilità ta' sħana baxxa. Fjamma b'temperatura għolja minn berner tal-gass (dijametru minimu ta' 5 mm) tiġi applikata fuq tarf tal-miċċa tat-trab sakemm it-trab jaqbad jew għal massimu ta' 2 minuti (5 minuti għal trab tal-metall jew għal liegi metalliċi). Għandu jkun innotat jekk il-kombustjoni timxix matul 200 mm tal-miċċa fil-perjodu ta' test ta' 4 minuti (jew 40 minuta għal trabijiet tal-metall). Jekk is-sustanza ma taqbadx u ma tmexxix il-kombustjoni permezz tal-fjammabilità bil-fjamma jew bin-nati bati bla fjamma matul 200 mm tal-miċċa tat-trab fil-perjodu ta' test ta'4 minuti (jew 40 minuta), allura s-sustanza m'għandhiex titqies bħala fjammabbli ħafna u mhuwa meħtieġ ebda test ieħor. Jekk is-sustanza tmexxi l-fjammabilità fuq 200 mm tal-miċċa tat-trab f'inqas minn 4 minuti, jew inqas minn 40 minuta għal trabijiet metalliċi, għandha titwettaq il-proċedura mfissra hawn taħt (punt 1.6.2 u ta' wara).

1.6.2. **It-test tar-rata ta' fjammabilità**

1.6.2.1. *Preparazzjoni*

Sustanzi f'forma ta' trab jew mrammla jiġu mimlija sfużi f'forma ta' 250 mm tul b'taqsima trasversali trijangulari ta' għoli intern ta' 10 mm u wisa' ta' 20 mm. Żewġ pjanċi tal-metall jiġu mmuntati fuq iż-żewġ naħat tal-forma bħala limitazzjonijiet laterali li joħorġu 2 mm 'il barra mit-tarf l-għoli tat-taqsima trasversali trijangulari (figura). Il-forma mbagħad titwaddab tliet darbiet minn għoli ta' 2 cm fuq superfiċje solida. Jekk ikun neċessarju l-forma terġa' tiġi mimlija. Il-limitazzjonijiet laterali mbagħad jitneħħew u s-sustanza żejda titneħħa. Pjanċa tal-bażi mhux kombustibbli, mhux poruża u b'konduċibilità ta' sħana baxxa titpoġġa fuq il-forma, l-apparat jinqaleb u l-forma titneħħa.

Sustanzi bħall-pejst jiġu mdellka fuq pjanċa tal-bażi mhux kombustibbli, mhux poruża u b'konduċibilità ta' sħana baxxa fil-forma ta' ħabel 250 mm fit-tul b'sezzjoni trasversali ta' madwar 1 cm^2.

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

Fil-każ ta' sustanza sensittiva għall-umdità, it-test għandu jitwettaq malajr kemm jista' jkun wara li jitneħħa mill-kontenitur.

1.6.2.3. *L-eżekuzzjoni tat-test*

Irranġa l-gozz f'kurrent ta' arja f'armarju li jiġbed id-duħħan.

Il-veloċità ta' l-arja trid tkun suffiċjenti biex tevita li d-duħħan joħroġ fil-laboratorju u m'għandhiex tkun varjata matul it-test. L-apparat irid ikun protett mill-kurrent ta' l-arja.

Fjamma taħraq minn berner tal-gass (dijametru minimu ta' 5mm) jintuża biex ikun mixgħul il-gozz minn naħa waħda. Meta l-gozz ikun inħaraq sa distanza ta' 80 mm, titkejjel ir-rata ta' ħruq fuq il-100 mm li jmiss.

▼B

It-test jitwettaq sitt darbiet, bl-użu ta' pjanċa nadifa u kiesħa kull darba, kemm-il darba ma jkunx osservat riżultat pożittiv qabel.

2. **DATA**

Il-ħin tal-ħruq mit-test ta' orjentazzjoni preliminari (1.6.1.) u l-inqas ħin ta' ħruq sa sitt testijiet (1.6.2.3.) huma relevanti għall-valutazzjoni.

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impuritajiet),

— id-deskrizzjoni tas-sustanza għat-test, l-istat fiżiku tagħha inkluż il-kontenut ta' l-umdità,

— ir-riżultati mit-testijiet ta' orjentazzjoni preliminari u mit-test tar-rata ta' ħruq jekk ikunu saru,

— ir-rimarki addizzjonali kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Sustanzi f'forma ta' trab, imrammla jew bħall-pejst għandhom jiġu kkunsidrati bħala fjammabbli ħafna meta l-ħin tal-ħruq fi kwalunkwe test skond il-proċedura tat-test mfisser f'1.6.2 huwa inqas minn 45 sekonda. Trabijiet tal-metall u liegi tal-metall huma kkunsidrati bħala fjammabbli ħafna meta huma jistgħu jitqabbdu u l-fjamma jew iż-żona ta' reazzjoni tinfirex fuq il-kampjun kollu f'10 minuti jew inqas.

4. **REFERENZI**

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

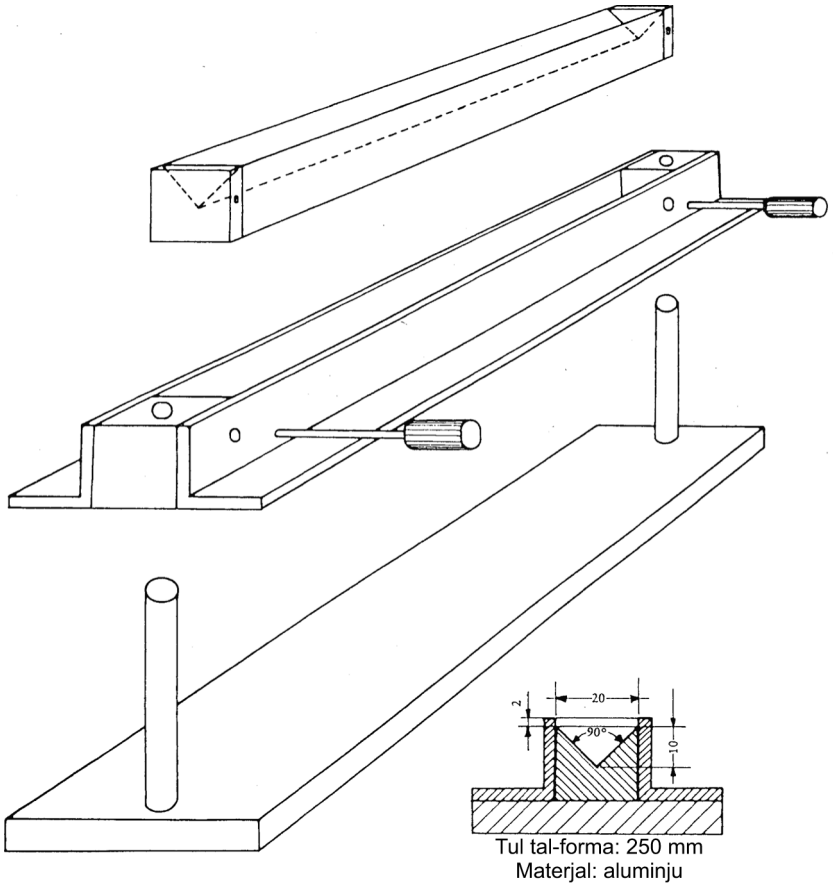
▼B

Appendiċi

Figura

Forom u aċċessorji għall-preparazzjoni tal-gozz

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



▼B

A.11. **FJAMMABILITÀ (GASSIJIET)**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

Dan il-metodu jippermetti d-determinazzjoni ta' jekk gassijiet imħallta ma' l-arja f'temperatura ambjentali (circa 20 °C) u l-pressjoni atmosferika humiex fjammabbli u, jekk huma ħekk, fuq liema skala ta' konċentrazzjonijiet. Taħlitiet ta' konċentrazzjonijiet li jiżdiedu tal-gass għat-test ma' l-arja jiġu esposti għal spark elettriku u jiġi osservat jekk jaqbdux.

1.2. TIFSIRA U UNITAJIET

L-iskala ta' fjammabilità hija l-iskala ta' konċentrazzjoni bejn l-inqas u l-ogħla limiti ta' splużjoni. L-inqas u l-ogħla limiti ta' splużjoni huma dawk il-limiti ta' konċentrazzjoni ta' gass fjammabbli mħallat ma' l-arja li fih ma sseħħx propagazzjoni tal-fjamma.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Il-konċentrazzjoni tal-gass fl-arja tiżdied pass pass u t-taħlita hija esposta f'kull stadju għal spark elettriku.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Apparat**

Ir-reċipjent għat-test huwa ċilindru tal-ħġieġ vertikali li għandu dijametru intern ta' 50 mm u għoli minimu ta' 300 mm. L-elettrodi għall-fjammabilità huma separati b'distanza ta' 3 sa 5 mm u huma mpoġġija 600 mm fuq il-qiegħ taċ-ċilindru. Iċ-ċilindru huwa mgħammar bi ftuħ għar-rilaxx tal-pressjoni. L-apparat għandu jkollu protezzjoni biex inaqqas kwalunkwe ħsara minn splużjoni.

Bħala sors ta' fjammabilità jintuża spark ta' induzzjoni permanenti ta' dewmien ta' 0,5 s, li huwa ġġenerat minn transformer ta' vultaġġ għoli b'vultaġġ ta' ħruġ minn 10 sa 15 kV (massimu ta' enerġija ta' dħul 300 W). Eżempju ta' apparat adattat huwa mfisser fir-referenza (2).

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

It-test irid isir f'temperatura ambjentali (circa 20 °C).

▼B

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

Konċentrazzjoni magħrufa ta' gass fl-arja tiġi mdaħħla fiċ-ċilindru tal-gass, permezz ta' pompi li jippompjaw proporzjon tad-doża. Spark jiġi mgħoddi mit-taħlita u jiġi osservat jekk il-fjamma tinqatax waħedha jew mill-għajn tal-fjammabilità u tinfirix b'mod indipendenti. Il-konċentrazzjoni tal-gass tvarja fi stadji ta' 1 % vol. sakemm isseħħ il-fjammabilità kif imfisser hawn fuq.

Jekk l-istruttura kimika tal-gass tindika li ma tkunx fjammabbli u tista' tiġi kkalkulata l-kompożizzjoni tat-taħlita stojkjometrika bl-arja, imbagħad taħlitiet fl-iskala minn 10 % anqas mill-kompożizzjoni stojkjometrika sa 10 % aktar minn din il-kompożizzjoni biss jeħtieġ li jkunu ttestjati fi stadji ta' 1 %.

2. **DATA**

L-okkorrenza tat-tixrid tal-fjamma hija l-unika DATA ta' informazzjoni relevanti għad-determinazzjoni ta' din il-proprjetà.

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impuritajiet),

— deskrizzjoni, bid-dimensjonijiet, ta' l-apparat użat,

— it-temperatura li fiha twettaq it-test,

— il-konċentrazzjonijiet ippruvati u r-riżultati miksuba,

— ir-riżultat tat-test: gass mhux fjammabbli jew gass fjammabbli ħafna,

— jekk ikun konkluż li l-gass mhuwiex fjammabbli allura l-iskala ta' konċentrazzjoni li fuqha kien ippruvat fi stadji ta' 1 % għandha tkun iddikjarata,

— ir-rimarki addizzjonali kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rrapurtati.

4. **REFERENZI**

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

(2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse- einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.- Tech. 1984, vo156, 2, 126-127.Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. 'Entwicklung

▼B

A.12. **FJAMMABILITÀ (KUNTATT MA' L-ILMA)**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

Dan il-metodu ta' test jista' jintuża biex ikun iddeterminat jekk ir-reazzjoni ta' sustanza ma' l-ilma jew l-arja umda twassalx għall-iżvilupp ta' ammonti perikoluż ta' gass jew gassijiet li jistgħu jkunu fjammabbli ħafna.

Il-metodu jista' jiġi applikat għal sustanzi likwidi kif ukoll solidi. Dan il-metodu mhux applikabbli għal sustanzi li jitqabbdu spontanjament meta jiġu f'kuntatt ma' l-arja.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Fjammabbli ħafna: sustanzi li, f'kuntatt ma' l-ilma jew l-arja umda, jevolvu gassijiet fjammabbli ħafna fi kwantitajiet perikoluż b'rata minima ta' 1 litru/kg għal kull siegħa.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU

Is-sustanza hija ttestjata skond is-sekwenza pass wara pass imfissra hawn taħt; jekk il-fjammabilità isseħħ fi kwalunkwe pass, ebda test ieħor mhuwa meħtieġ. Jekk ikun magħruf li s-sustanza ma tirreaġixxix b'mod vjolenti ma' l-ilma allura jsir pass 4 (1.3.4).

1.3.1. **Pass 1**

Is-sustanza għat-test titpoġġa f'reċipjent bl-ilma distillat f'20 °C u jiġi nnotat jekk il-gass li evolva jaqbadx jew le.

1.3.2. **Pass 2**

Is-sustanza għat-test titpoġġa fuq karta filtru fuq il-wiċċ ta' dixx li fih ilma distillat f'20 °C u jiġi nnotat jekk il-gass li evolva jaqbadx jew le. Il-karta filtru tintuża biss biex iżżomm lis-sustanza f'post wieħed biex jikbru ċ-ċansijiet tal-fjammabilità.

1.3.2. **Pass 3**

Is-sustanza għat-test hija magħmula f'gozz approssimattivament 2 cm għoli u 3 cm dijametru. Ftit qtar ta' ilma jiżdiedu mal-gozz u jiġi nnotat jekk il-gass evolut jaqbadx jew le.

1.3.4. **Pass 4**

Is-sustanza għat-test tiġi miżjuda ma' ilma distillat f'20 C u r-rata ta' evoluzzjoni tal-gass titkejjel fuq perjodu ta' seba' siegħat, f'intervalli ta' siegħa. Jekk ir-rata ta' evoluzzjoni mhijiex kostanti, jew qed tiżdied wara seba' siegħat, il-ħin tal-kejl għandu jittawwal għal massimu ta' ħamest ijiem. It-test jista' jitwaqqaf jekk ir-rata fi kwalunkwe ħin taqbeż il-1 litru/kg għal kull siegħa.

▼B

1.4. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Pass 1**

1.6.1.1. *Kondizzjonijiet tat-test*

It-test irid isir f'temperatura ambjentali (circa 20 C).

1.6.1.2. *L-eżekuzzjoni tat-test*

Kwantità żgħira (approssimattivament 2 mm dijametru) tas-sustanza għat-test għandha titpoġġa f'reċipjent li fih ilma distillat. Għandu jkun innotat jekk (i) evolviex xi gass u (ii) jekk seħħitx il-fjammabbiltà tal-gass. Jekk isseħħ il-fjammabbiltà tal-gass mhuwa meħtieġ l-ebda test ieħor tas-sustanza għaliex is-sustanza hija meqjusa bħala perikoluża.

1.6.2. **Pass 2**

1.6.2.1. *Apparat*

Karta filtru titpoġġa tgħum fil-wiċċ ta' l-ilma distillat fi kwalunkwe reċipjent adattat, eż. dixx għall-evaporazzjoni b'dijametru ta' 100 mm.

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

It-test irid isir f'temperatura ambjentali (circa 20 ^{o}C).

1.6.2.3. *L-eżekuzzjoni tat-test*

Kwantità żgħira tas-sustanza għat-test (approssimattivament 2 mm dijametru) għandha titpoġġa fin-nofs tal-karta filtru. Għandu jkun innotat jekk (i) evolviex xi gass u (ii) jekk seħħitx il-fjammabilità tal-gass. Jekk isseħħ it-tqabbid tal-gass mhuwa meħtieġ l-ebda test ieħor tas-sustanza għaliex is-sustanza hija meqjusa bħala perikoluża.

1.6.3. **Pass 3**

1.6.3.1. *Kondizzjonijiet tat-test*

It-test irid isir f'temperatura ambjentali (circa 20 ^{o}C).

1.6.3.2. *L-eżekuzzjoni tat-test*

Is-sustanza għat-test hija magħmula f'gozz approssimattivament 2 cm għoli u 3 cm dijametru bi ftit fond fil-quċċata. Jiżdiedu ftit qtar ta' ilma fil-post fond u għandu jkun innotat jekk (i) evolviex xi gass u (ii) jekk seħħitx il-fjammabilità tal-gass. Jekk isseħħ il-fjammabbiltà tal-gass mhuwa meħtieġ l-ebda test ieħor tas-sustanza għaliex is-sustanza hija meqjusa bħala perikoluża.

▼B

1.6.4. **Pass 4**

1.6.4.1. *Apparat*

L-apparat jiġi mmuntat kif jidher fil-figura.

1.6.4.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

Spezzjona l-kontenitur tas-sustanza għat-test għal xi trab < 500 μm (daqs tal-partikula). Jekk it-trab jikkostitwixxi aktar minn 1 % w/w tat-total, jew jekk il-kampjun jista' jitfarrak malajr, allura l-ammont kollu tas-sustanza għandu jitfarrak fi trab qabel it-test sabiex jippermetti tnaqqis fid-daqs tal-partikula matul il-ħażna u l-immaniġġar; inkella s-sustanza għandha tkun ittestjata kif tkun irċevuta. It-test irid isir f'temperatura ambjentali (circa 20 ^{o}C) u pressjoni atmosferika.

1.6.4.3. *L-eżekuzzjoni tat-test*

Minn 10 sa 20 ml ta' ilma jitpoġġew fil-lembut tal-qtar ta' l-apparat u 10 g tas-sustanza jitpoġġew fi flixkun koniku. Il-volum tal-gass li jevolvi jista' jitkejjel bi kwalunkwe mezz adattat. It-tapp tal-lembut tal-qtar jiġi miftuħ biex iħalli l-ilma jidħol fil-flixkun koniku u l-arloġġ tal-ħin jibda jitħaddem. L-evoluzjoni tal-gass titkejjel kull siegħa matul perjodu ta' seba' sigħat. Jekk, matul dan il-perjodu, l-evoluzzjoni tal-gass hija irregolari, jew jekk, fi tmiem dan il-perjodu, ir-rata ta' l-evoluzzjoni tal-gass qed tiżdied, allura l-kejl għandu jitkompla sa ħamest ijiem. Jekk, fi kwalunkwe ħin tal-kejl ir-rata tal-gass taqbeż il-1 litru/kg għal kull siegħa, it-test għandu jieqaf. It-test għandu jsir għal tliet darbiet.

Jekk l-identità kimika tal-gass ma tkunx magħrufa, il-gass għandu jkun analizzat. Meta l-gass jinkludi komponenti fjammabbli ħafna u mhux magħruf jekk it-taħlita kollha hijiex fjammabbli ħafna, taħlita ta' l-istess kompożizzjoni għandha titħejja u tkun ppruvata skond il-metodu A.11.

2. **DATA**

Is-sustanza titqies li hija perikoluża jekk:

— isseħħ fjammabilità spontanja f'kull stadju tal-proċedura tat-test,

jew

— hemm evoluzzjoni ta' gass fjammabbli b'rata akbar minn 1 litru/kg tas-sustanza għal kull siegħa.

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impuritajiet),

— dettalji ta' kwalunkwe Preparazzjoni inizjali tas-sustanza għat-test,

▼B

— ir-riżultati tat-testijiet (passi 1, 2, 3 u 4),

— l-identità kimika tal-gass evolut,

— ir-rata ta' evoluzzjoni ta' gass jekk pass 4 (1.6.4) jitwettaq,

— kwalunkwe rimarki relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

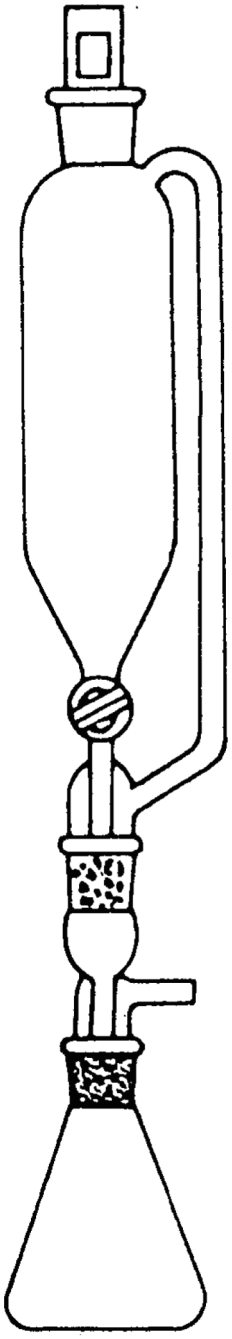
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Appendiċi

Figura

Apparat



▼B

A.13. **PROPRJETAJIET PIROFORIĊI TA' SOLIDI U LIKWIDI**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

Il-proċedura tat-test hija applikabbli għal sustanzi solidi jew likwidi, li, f'ammonti żgħar, jaqbdu spontanjament f'ħin qasir wara li jagħmlu kuntatt ma' l-arja f'temperatura ambjentali (circa 20 °C).

Sustanzi li jeħtieġ li jkunu esposti għall-arja għal sigħat jew ġranet f'temperatura ambjentali jew f'temperaturi elevati qabel ma sseħħ il-fjammabilità mhumiex koperti b'dan il-metodu ta' test.

1.2 TIFSIRIET U UNITAJIET

Sustanzi huma kkunsidrati li għandhom proprjetajiet piroforiċi jekk huma jaqbdu jew jikkawżaw ħruq sakemm l-oġġett isir faħam skond il-kondizzjonijiet mfissra f'1.6.

L-awto-fjammabilità ta' likwidi tista' tkun ittestjata bl-użu tal-metodu A.15 Temperatura ta' awto-fjammabilità (likwidi u gassijiet).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Is-sustanza, kemm jekk solida kif ukoll likwida, tiżdied ma' *carrier* inert u titqiegħed f'kuntatt ma' l-arja f'temperatura ambjentali għal perjodu ta' ħames minuti. Jekk is-sustanzi likwidi ma jaqbdux allura huma assorbiti f'karta filtru u esposti għall-arja f'temperatura ambjentali (circa 20 °C) għal ħames minuti. Jekk solidu jew likwidu jaqbad, jew likwidu jaqbad jew jagħmel ifaħħam karta filtru, allura s-sustanza hija meqjusa bħala piroforika.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ripetibbilità: minħabba l-importanza fir-rigward tas-ikurezza, riżultat pożittiv wieħed huwa suffiċjenti biex is-sustanza tiġi kkunsidrata bħala piroforika.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TEST

1.6.1. **Apparat**

Kapsula tal-porċellana ta' dijametru circa 10 cm tiġi mimlija bi trab *diatomaceous* sa għoli ta' madwar 5 mm f'temperatura ambjentali (circa 20 °C).

Nota:

It-trab *diatomaceous* jew kwalunkwe sustanza inerta komparabbli oħra li hija disponibbli b'mod ġenerali għandha titqies bħala rappreżentattiva ta' ħamrija li fiha s-sustanza għat-test tista' tintefa' f'każ ta' inċident.

Karta filtru niexfa hija meħtieġa biex ikunu ttestjati likwidi li ma jaqbdux f'kuntatt ma' l-arja meta jkunu f'kuntatt ma' *carrier* inert.

▼B

1.6.2. **L-eżekuzzjoni tat-test**

a) *Solidi trab*

Minn 1 sa 2 cm^3 mis-sustanza għat-test jitferraw minn għoli ta' circa 1 m fuq superfiċje mhux kombustibbli u jiġi osservat jekk is-sustanza taqbadx matul it-tferrigħ jew fi żmien ħames minuti wara li toqgħod.

It-test jitwettaq sitt darbiet kemm-il darba ma sseħħx il-fjammabilità.

b) *Likwidi*

Madwar 5 cm^3 mil-likwidu għat-test jitferra' f'kapsula tal-porċellana mħejjija u jiġi osservat jekk is-sustanza taqbadx fi żmien ħames minuti.

Jekk ma sseħħ l-ebda fjammabilità f'sitt testijiet, għandhom jitwettqu dawn it-testijiet:

Kampjun ta' 0,5 mm jintefa' permezz ta' siringa fuq karta filtru bit-tarf f'forma ta' serrieq u jiġi osservat jekk isseħħx fjammabilità jew ħruq sakemm titfaħħam il-karta filtru fi żmien ħames minuti li jiżdied il-likwidu. It-test jitwettaq tliet darbiet kemm-il darba ma sseħħx il-fjammabbiltà u t-tfaħħim.

2. **DATA**

2.1. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

It-test jista' jitwaqqaf hekk kif iseħħ riżultat pożittiv f'xi wieħed mit-testijiet.

2.2. VALUTAZZJONI

Jekk is-sustanza taqbad fi żmien ħames minuti meta tiżdied ma' *courier* inert u tkun esposta għall-arja, jew jekk sustanza likwida tinħaraq sakemm issir faħam jew tqabbad karta filtru fi żmien ħames minuti meta miżjuda jew esposta għall-arja, hija kkkunsidrata bħala piroforika.

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impuritajiet),

— ir-riżultat tat-test,

— kwalunkwe rimarka relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

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

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

▼B

A.14. PROPRJETAJIET ESPLOŻIVI

1. METODU

1.1. DAĦLA

Il-metodu jipprovdi skema ta' testijiet biex jiġi ddeterminat jekk sustanza solida jew f'forma ta' pejst tippreżentax perikolu ta' splużjoni meta tkun sottomessa għall-effett ta' fjamma (sensittività termika), jew għal xokk jew frizzjoni (sensittività għal stimuli mekkaniċi), u jekk sustanza likwida tippreżentax periklu ta' splużjoni meta sottomessa għall-effett ta' fjamma jew xokk.

Il-metodu fih tliet partijiet:

(a) test ta' sensittività termika (1);

(b) test ta' sensittività mekkanika fir-rigward ta' xokk (1);

(ċ) test ta' sensittività mekkanika fir-rigward ta' frizzjoni (1).

Il-metodu jforni DATA biex tkun evalwata l-probabbiltà li tinbeda splużjoni permezz ta' ċerti stimuli komuni. Il-metodu mhuwiex maħsub biex jaċċerta jekk sustanza hijiex kapaċi li tesplodi taħt kwalunkwe kondizzjonijiet.

Il-metodu huwa adattat biex ikun iddeterminat jekk sustanza tippreżentax periklu ta' splużjoni (termika jew sensittività mekkanika) taħt kondizzjonijiet partikulari speċifikati fid-Direttiva. Huwa bbażat fuq numru ta' tipi ta'apparati li huma użati ħafna internazzjonalment (1) u li s-soltu jagħtu riżultati sinifikattivi. Huwa rikonoxxut li l-metodu mhuwiex definittiv. Apparat alternattiv għal dak speċifikat jista' jintuża kemm-il darba huwa rikonoxxut internazzjonalment u li r-riżultati jistgħu jkunu korrelatati adegwatament ma' dawk minn apparat speċifikat.

M'hemmx għalfejn jitwettqu t-testijiet meta informazzjoni termodinamika hija disponibbli (eż. is-sħana tal-formazzjoni, is-sħana tad-dekompożizzjoni) u/jew l-assenza ta' ċerti gruppi reattivi (2) fil-formula strutturali tistabbilixxi mingħajr dubju raġjonevoli li s-sustanza mhijiex kapaċi li tiddekomponi malajr bl-evoluzzjoni tal-gassijiet jew bir-rilaxx ta' sħana (i.e. il-materjal ma jippreżenta l-ebda riskju ta' splużjoni). Test ta' sensittività mekkanika fir-rigward ta' frizzjoni mhuwiex meħtieġ għal-likwidi.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Esplożiv:

Sustanzi li jistgħu jisplodu taħt l-effett ta' fjamma jew li huma sensittivi għal xokk jew frizzjoni fl-apparat speċifikat (jew li huma sensittivi mekkanikament aktar minn 1,3 *dinitrobenzene* f'apparat alternattiv).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

1,3-*dinitrobenzene*, prodott ta' kristallina teknika mgħarbul biex jgħaddi minn 0,5 mm, għall-metodi ta' frizzjoni u ta' xokk.

Perhydro-1.3.5-*trinitro*-1.3.5-*triazine* (RDX, *hexogen*, ċiklonite-CAS 121-82-4), rikristallizzat minn *cyclohexogen* fl-ilma, mgħarbel fl-ilma minn 250 μm u miżmum fuq għarbiel ta' 150 μm u mnixxef f'103 ± 2 °C (għal erba' sigħat) għat-tieni serje ta' frizzjoni u testijiet ta' xokk.

▼B

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Testijiet preliminari huma neċessarji biex ikunu stabbiliti kondizzjonijiet bla periklu għall-eżekuzzjoni tat-tliet testijiet ta' sensittività.

1.4.1. **Testijiet ta' sikurezza fl-immaniġġjar (3)**

Għal raġunijiet ta' sikurezza, qabel jitwettqu t-testijiet ewlenin, kampjuni żgħar ħafna (madwar 10 mg) tas-sustanza jiġu soġġetti għas-sħana mingħajr għeluq fi fjamma tal-gass, għal xokk fi kwalunkwe forma konvenjenti ta' apparat u għal frizzjoni bl-użu ta' martell b'ras ta' l-injam kontra inkwina jew kwalunkwe forma ta' magna għall-frizzjoni. L-għan huwa li jkun assigurat jekk is-sustanza hijiex daqshekk sensittiva u esplożiva li t-testijiet ta' sensittività preskritti, b'mod partikolari dak tas-sensittività termika, għandhomx jitwettqu bi prekawzjonijiet speċjali sabiex jiġi evitat korriment ta' l-operatur.

1.4.2. **Sensittività termika**

Il-metodu jinvolvi t-tisħin tas-sustanza f'tubu ta' l-azzar, magħluq bi pjanċi miftuħa b'dijametri ta' toqob differenti, biex ikun iddeterminat jekk is-sustanza għandhiex tendenza li tisplodi taħt kondizzjonijiet ta' sħana intensa u għeluq definit.

1.4.3. **Sensittività mekkanika (xokk)**

Il-metodu jinvolvi li s-sustanza tkun soġġetta għal xokk minn piż speċifikat mwaqqa' minn għoli speċifikat.

1.4.4. **Sensittività mekkanika (frizzjoni)**

Il-metodu jinvoli li sustanza solida jew f'forma ta' pejst tkun soġġetta għal frizzjoni bejn spuperfiċje standard taħt kondizzjonijiet speċifiċi ta' tagħbija u moviment relattiv.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Sensittività termika (effett ta' fjamma)**

1.6.1.1. *Apparat*

L-apparat jikkonsisti f'tubu ta' l-azzar li ma jerġax jintuża bi strument li jagħlaq u li jerġa' jintuża (figura 1) installat fi strument ta' sħana u ta' protezzjoni. Kull tubu huwa miġbud minn pjanċa ta' l-azzar (ara l-Appendiċi) u li għandu dijametru intern ta' 24 mm, tul ta' 75 mm u ħxuna tal-qoxra ta' 0,5 mm. It-tubu għandu flanġ fil-ġenb tal-ftuħ biex ikun jista' jingħalaq bl-immuntar tal-pjanċa miftuħa. Dan jikkonsisti fi pjanċa miftuħa li tirreżisti l-pressjoni, b'toqba ċentrali, marbuta sewwa ma' tubu bl-użu ta' vit f'żewġ partijiet (vit u skorfina bil-kamin). Il-vit u l-iskorfina bil-kamin huma magħmulin minn azzar tal-kromju-manganiż (ara l-Appendiċi) li ma jisparkjax sa 800 °C. Il-pjanċi miftuħin huma 6 mm ħoxnin, magħmula minn azzar reżistenti għas-sħana, u huma disponibbli b'firxa ta' dijametri fil-ftuħ.

▼B

1.6.1.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

Normalment is-sustanza tiġi ttestjata kif tkun riċevuta għalkemm f'ċerti każijiet, eż. jekk ippressata, magħmula f'forma jew ikkondensata b'xi mod ieħor, ikun neċessarju li s-sustanza tiġi ttestjata wara it-tifrik.

Għal solidi, il-piż tal-materjal għall-użu f'kull test huwa ddeterminata bl-użu ta' testijiet f'żewġ stadji f'forma niexfa. Tubu miksi bil-qatran jimtela b"9 cm^3 ta' sustanza u s-sustanza tiġi kompatta b'forza ta' 80 N applikata fuq it-trasversali totali tat-tubu. Għal raġunijiet ta' sikurezza jew f'każijiet fejn il-forma fiżika tal-kampjun tista' tinbidel b'kompressjoni jistgħu jintużaw proċeduri ta' mili oħrajn, eż. jekk is-sustanza hija sensittiva ħafna għal frizzjoni allura l-ikkompattjar mhuwiex adattat. Jekk il-materjal huwa kompressibbli jiżdied aktar materjal u jiġi kkompattjat sakemm it-tubu jimtela" sa 55 mm minn fuq. Il-piż totali użat biex jimtela' t-tubu sal-livell ta' 55 mm huwa ddeterminat u jsiru żewġ żidiet oħra, kull waħda kkompattjata b'forza ta' 80N. Imbagħad jiżdied il-materjal jew bl-ikkompattjar, jew billi jinħareġ barra, kif ikun meħtieġ, sabiex it-tubu jitħalla mimli sa livell ta' 15 mm minn fuq. Jitwettaq test ieħor niexef, fil-bidu bi kwantità kkompattjata ta' terz mill-piż totali misjuba fl-ewwel test niexef. Żewġ żidiet oħra minn dawn isiru flimkien ma' ikkompattjar ta' 80 N u l-livell tas-sustanza fit-tubu jiġi aġġustat sa 15 mm minn fuq biż-żieda jew bit-tnaqqis tal-materjal kif meħtieġ. L-ammont ta' solidu ddeterminat fit-tieni test niexef jintuża f'kull test; billi l-mili jitwettaq fi tliet ammonti ugwali, kull wieħed kompressat sa 9 cm^3 b'kull mod ta' forza neċessarju. (Dan jista' jkun iffaċilitat bl-użu ta' ħoloq li joħolqu spazju).

Likwidi u ġels jintefgħu fit-tubu sa għoli ta' 60 mm b'attenzjoni partikulari fejn jidħlu l-ġels biex tkun evitata l-formazzjoni ta' spazju vojt. L-iskorfina bil-kamin tiddaħħal madwar it-tubu mill-qiegħ, tiddaħħal il-pjanċa mtaqqba u l-vit jiġi ssikkat wara l-applikazzjoni ta' ftit lubrikant bbażat fuq *disulphide tal-molibdenu*. Huwa essenzjali li jiġi ċċekkjat li xejn mis-sustanza ma jinqabad bejn il-flanġ u l-pjanċa, jew fil-ħjut.

Is-sħana tiġi pprovduta mill-propan meħud minn ċilindru industrijali, mgħammar b'regolatur tal-pressjoni (60 sa 70 mbar), permezz ta' arloġġ u distribwit ugwalment (kif indikat b'osservazzjoni viżwali tal-fjammi mill-berners) minn manifold għal erba' berners. Il-berners huma lokalizzati madwar il-kompartiment tat-test kif jidher f'figura 1. L-erba' berners flimkien għandhom konsum ta' madwar 3,2 litri ta' propan għal kull minuta. Jistgħu jintuża gassijiet kombustibbli u berners alternattivi iżda r-rata tat-tisħin trid tkun kif speċifikata fil-figura 3. Għall-apparati kollha, ir-rata tat-tisħin trid tkun iċċekkjata perjodikament bl-użu ta' tubi mimlija b*' dibutyl phthalate* kif indikat fil-figura 3.

1.6.1.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet*

Kull test jitwettaq sakemm jew it-tubu jitfarrak jew it-tubu jkun issaħħan għal ħames minuti. Test li jirriżulta fil-frammentazzjoni tat-tubu fi tliet biċċiet jew aktar, li f'xi każijiet jistgħu jkunu kkonnettjati ma' xulxin bi strixxi dojoq tal-metall kif muri fil-figura 2, huwa evalwat bħala wieħed li jagħti splużjoni. Test li jirriżulta f'biċċiet inqas jew ebda frammentazzjoni jiġi meqjus bħala wieħed li ma tax splużjoni.

▼B

L-ewwel titwettaq serje ta' tliet testijiet bi pjanċa mtaqqba b'dijametru ta' 6,0 mm u, jekk ma tinkiseb ebda splużjoni, titwettaq serje oħra ta' tliet testijiet bi pjanċa mtaqqba b'dijametru ta' 2,0 mm. Jekk isseħħ splużjoni matul xi waħda mis-serje ta' testijiet allura mhumiex meħtieġa aktar testijiet.

1.6.1.4. *Valutazzjoni*

Ir-riżultat tat-test jiġi kkunsidrat bħala pożittiv jekk isseħħ splużjoni f'xi waħda mis-serje ta' testijiet t'hawn fuq.

1.6.2. **Sensittività mekkanika (xokk)**

1.6.2.1. *Apparat (figura 4)*

Il-partijiet essenzjali ta' apparat bil-martell li jaqa' tipiku huma blokka ta' l-azzar fondut bil-baži, inkwina, kolonna, gwidi, piżijiet li jaqgħu, apparat għar-rilaxx u reċipjent għall-kampjun. L-inkwina ta' l-azzar 100 mm (dijametru) x 70 mm (għoli) tiġi invitata mal-wiċċ tal-blokka ta' l-azzar 230 mm (twila) x 250 mm (wiesa') x 200 mm (għolja) b'baži fonduta 450 mm (twila) x 450 mm (wiesa') x 60 mm (għolja). Kolonna magħmula minn tubu ta' l-azzar mingħajr saldatura, tintrabat mar-reċipjent invitat ma' wara tal-blokka ta' l-azzar. Erba' viti jorbtu lill-apparat ma' blokka tal-konkrit solida 60 x 60 x 60 cm b'tali mod li l-gwidi huma assolutament vertikali u l-piżijiet li jaqgħu jistgħu jaqgħu liberament. Piżijiet ta' 5 u 10 kg, magħmula minn azzar solidu, huma disponibbli għall-użu. Il-parti ta' fuq li tagħmel impatt għal kull piż hija ta' azzar imwebbes, HRC 60 sa 63, u għandha dijametru minimu ta' 25 mm.

Il-kampjun għat-test jingħalaq f'apparat għax-xokk li jikkonsistit f'żewġ ċilindri ta' l-azzar solidu koassjali, wieħed fuq l-ieħor, f'ħolqa gwida ċilindrika mħaffra. Iċ-ċilindri ta' l-azzar solidu għandhom ikunu ta' 10 (- 0,003, - 0,005) mm dijamtru u 10 mm għoli u jkollhom uċuħ ippolixxjati, ġnub fit-tond (raġġ tal-kurvatura ta' 0,5 mm) u l-għebusija ta' HRC minn 58 sa 65. Iċ-ċilindru mħaffer irid ikollu dijametru estern ta' 16 mm, toqba ppolixxjata ta' 10 (+ 0,005, + 0,010) mm u għoli ta' 13 mm. L-apparat għax-xokk jiġi mmuntat fuq inkwina intermedjarja (26 mm dijametru u 26 mm għoli) magħmula minn azzar u ċċentrata b'ħolqa b'perforazzjonijiet biex tippermetti l-ħruġ ta' dħaħen.

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

Il-volum tal-kampjun irid ikun 40 mm^3, jew volum li huwa adattat ma' kwalunkwe apparat alternattiv. Sustanzi solidi għandhom ikunu ppruvati fi stat niexef u mħejjija kif ġej:

(a) sustanzi mfarrka jiġu mgħarbula (daqs tat-toqba ta' l-għarbiel 0,5 mm); dak kollu li jgħaddi mill-għarbiel jintuża għat-test;

(b) sustanzi ppressati, fonduti jew altrimenti kondensati jiġu mkissra fi bċejjeċ żgħar u mgħarbula; il-frazzjoni mgħarbula minn 0,5 sa 1 mm dijametru tintuża għat-test u għandha tkun rappreżentattiva tas-sustanza oriġinali.

Sustanzi pprovduti normalment bħala pejst għandhom ikunu ppruvati fi stat niexef fejn possibbli jew, wara t-tneħħija ta' l-ammont massimu possibbli ta' dilwent. Sustanzi likwidi jiġu ppruvati bi spazju ta' 1 mm bejn iċ-ċilindri ta' l-azzar ta' fuq u t'isfel.

▼B

1.6.2.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet*

Jitwettqu serje ta' sitt testijiet bit-twaqqigħ tal-piż ta' 10 kg minn 0,40 m (40 J). Jekk tinkiseb splużjoni matul is-sitt testijiet f'40 J, trid titwettaq serje oħra ta' sitt testijiet, bit-twaqqigħ ta' piż ta' 5 kg minn 0,15 m (7,5 J). F'apparati oħrajn, il-kampjun jitqabbel mas-sustanza ta' referenza magħżula bl-użu ta' proċedura stabbilita (eż. bit-teknika ta' 'l fuq u 'l isfel eċċ.).

1.6.2.4. *Valutazzjoni*

Ir-riżultat tat-test jiġi kkunsidrat pożittiv jekk splużjoni (il-bidu ta' fjamma u/jew ta' rapport huma ekwivalenti għal splużjoni) isseħħ ta' l-inqas darba f'xi wieħed mit-testijiet bl-apparat għax-xokk speċifikat jew il-kampjun huwa aktar sensittiv minn 1, 3–*dinitrobenzene* jew RDX f'test tax-xokk alternattiv.

1.6.3. **Sensittività mekkanika (frizzjoni)**

1.6.3.1. *Apparat (figura 5)*

L-apparat tal-frizzjoni jikkonsisti fi pjanċa tal-baži magħmula minn azzar fondut li fuqha jiġi mmuntat l-apparat ta' frizzjoni. Dan jikkonsisti f'ċilindru fiss tal-porċellana u pjanċa mobbli tal-porċellana. Il-pjanċa tal-porċellana tinżamm fuq keriġ li tiġri fuq żewġ gwidi. Il-keriġ tiġi kkonnettjata ma' mutur ta' l-elettriku permezz ta' virga li tikkonnettja, kamm eċċentriku u apparat ta' trażmissjoni adattat biex il-pjanċa tal-porċellana titmexxa, darba waħda, lura u'l quddiem taħt iċ-ċilindru tal-porċellana għal distanza ta' 10 mm. Iċ-ċilindru jista' jitgħabba b'eż. 120 jew 360 newtons.

Il-pjanċi ċatti tal-porċellana huma magħmula minn porċellana teknika bajda (ħruxija minn 9 sa 32 μm) u għandhom dimensjonijiet 25 mm (tul) x 25 mm (wisa') × 5 mm (għoli). Iċ-ċilindru tal-porċellana huwa magħmul ukoll minn porċellana teknika bajda u huwa twil 15 m, għandu dijametru ta' 10 mm u wċuħ tal-ġnub sferikali ħorox b'raġġ ta' kurvatura ta' 10 mm.

1.6.3.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

Il-volum tal-kampjun irid ikun ta' 10 mm^3, jew volum li huwa adattat għal kwalunkwe apparat alternattiv.

Sustanzi solidi għandhom ikunu ttestjati fi stat niexef u mħejjija kif ġej:

(a) sustanzi mfarrka jiġu mgħarbula (daqs tat-toqba ta' l-għarbiel 0,5 mm); dak kollu li jgħaddi mill-għarbiel jintuża għat-test;

(b) sustanzi ppressati, fonduti jew altrimenti kkondensati jiġu mkissra fi bċejjeċ żgħar u mgħarbula; il-frazzjoni mgħarbula ta' < 0,5 mm dijametru tintuża għat-test.

Sustanzi forniti normalment bħala pejsts għandhom ikunu ppruvati fi stat niexef fejn huwa possibbli. Jekk is-sustanza ma tistax titħejja fi stat niexef, il-pejst (wara t-tneħħija ta' l-ammont massimu possibbli ta' dilwent) jiġi ppruvat bħala liega 0,5 mm ħoxna, 2 mm wiesa', 10 mm twila, ippreparata ma' ta' qabel.

▼B

1.6.3.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet*

Iċ-ċilindru tal-porċellana jiddaħħal fil-kampjun għat-test u tiġi applikata l-forza. Meta jkun qed jitwettaq it-test, il-marki ta' l-isponża tal-pjanċa tal-porċellana jridu jkunu b'mod trasversali mad-direzzjoni tal-moviment. Trid tingħata attenzjoni li ċ-ċilindru jistrieħ fuq il-kampjun, li jkun hemm materjal tat-test suffiċjenti taħt iċ-ċilindru u anke li l-pjanċa timxi b'mod korrett taħt iċ-ċilindru. Għal sustanzi f'forma ta' pejst, gejġ bi ħxuna ta' 0,5 mm b'xaqq ta' 2 x 10 mm jintuża biex tkun applikata s-sustanza mal-pjanċa. Il-pjanċa tal-porċellana trid timxi 10 mm il quddiem u lura taħt iċ-ċilindru tal-porċellana f'ħin ta' 0,44 sekondi. Kull parti tas-superfiċje tal-pjanċa trid tintuża darba biss; iż-żewġt itruf ta' kull ċilindru jservu għal żewġ provi u kull waħda miż-żewġ superfiċji tal-pjanċa sservi għal tliet provi.

Jitwettqu serje ta'sitt testijiet b'tagħbija ta' 360 N. Jekk riżultat pożittiv jinkiseb matul dawn is-sitt testijiet, serje oħra ta' sitt testijiet trid titwettaq b'tagħbija ta' 120 N. F'apparati oħra, il-kampjun huwa mqabbel ma' sustanza ta' referenza magħżula bl-użu ta' proċedura stabbilita (eż. teknika ta' 'l fuq u 'l isfel, eċċ.).

1.6.3.4. *Valutazzjoni*

Ir-riżultat tat-test jiġi kkunsidrat pożittiv jekk splużjoni (tifqigħ u/jew rapport jew kombustibilità fi fjamma huma ekwivalenti għal splużjoni) titwettaq għall-inqas darba f'xi wieħed mit-testijiet bl-apparat speċifiku ta' frizzjoni jew il-kriterji ekwivalenti f'test ta' frizzjoni alternattiv ikunu ssodisfati.

2. **DATA**

Fil-prinċipju, sustanza hija kkunsidrata li tippreżenta periklu ta' splużjoni fis-sens tad-Direttiva jekk riżultat pożittiv jinkiseb fit-test termiku, bix-xokk jew bis-sensittività tal-frizzjoni.

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— identità, kompożizzjoni, purità, kontenut ta' umdità eċċ. tas-sustanza ttestjata.

— il-forma fiżika tal-kampjun u jekk kienx imfarrak, miksur u/jew mgħarbul,

— l-osservjazzjonijiet matul it-testijiet għas-sensittività termika (eż. piż b'kampjun, numru ta' frammenti eċċ.),

— l-osservjazzjonijiet matul it-testijiet għas-sensittività mekkanika (eż. il-formazzjoni ta' ammonti konsiderevoli ta' duħħan jew dekompożizzjoni kompleta mingħajr rapport, fjammi, sparks, rapport, tifqigħ eċċ.),

— ir-riżultati ta' kull test,

— jekk intuża apparat alternattiv, trid tingħata ġustifikazzjoni alternattiva kif ukoll xhieda ta' korelazzjoni bejn riżultati miksuba b'apparat speċifiku u dawk miksuba b'apparat ekwivalenti,

▼B

— kwalunkwe kummenti utli bħal referenza għal testijiet bi prodotti simili li jistgħu jkunu relevanti għall-interpretazzjoni proprja tar-riżultati,

— ir-rimarki addizzjonali kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. INTERPRETAZZJONI U VALUTAZZJONI TA' RIŻULTATI

Ir-rapport tat-test irid isemmi kwalunkwe riżultati li huma kkunsidrati foloz, anomali jew mhux rappreżentattivi. Jekk xi wieħed mir-riżultati għandu jitwarrab, għandha tingħata spjegazzjoni u r-riżultati ta' l-ittestjar supplimentari. Sakemm riżultat anomalu ma jkunx spjegat, irid ikun aċċettat skond l-apparenza u użat biex tkun ikklassifikata s-sustanza skond il-każ.

4. **REFERENZI**

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

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

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

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

▼B

Appendiċi

Eżempju ta' speċifikazzjoni ta' materjal għal test ta' sensittività termika (ara DIN 1623)

(1) Tubu: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.0336.505 g

(2) Pjanċa mħaffra: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.4873

(3) Il-vit fil-kamin u l-iskorfina: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.3817

Figura 1

Apparat għat-test tas-sensittività termika

(d-dimensjonijiet kollha f'millimetri)

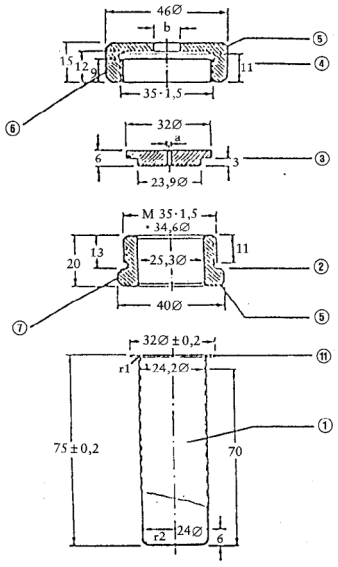


Fig. 1a Tubu ta' l-azzar u aċċessorji

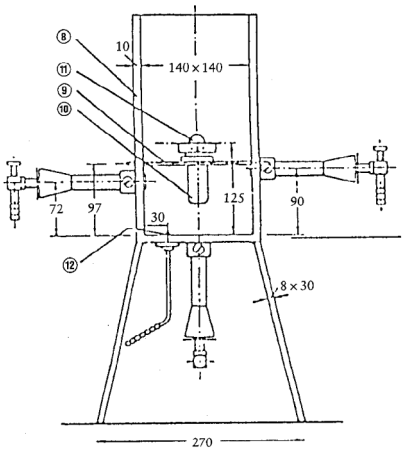


Fig. 1b Apparat ta' tisħin u protettiv

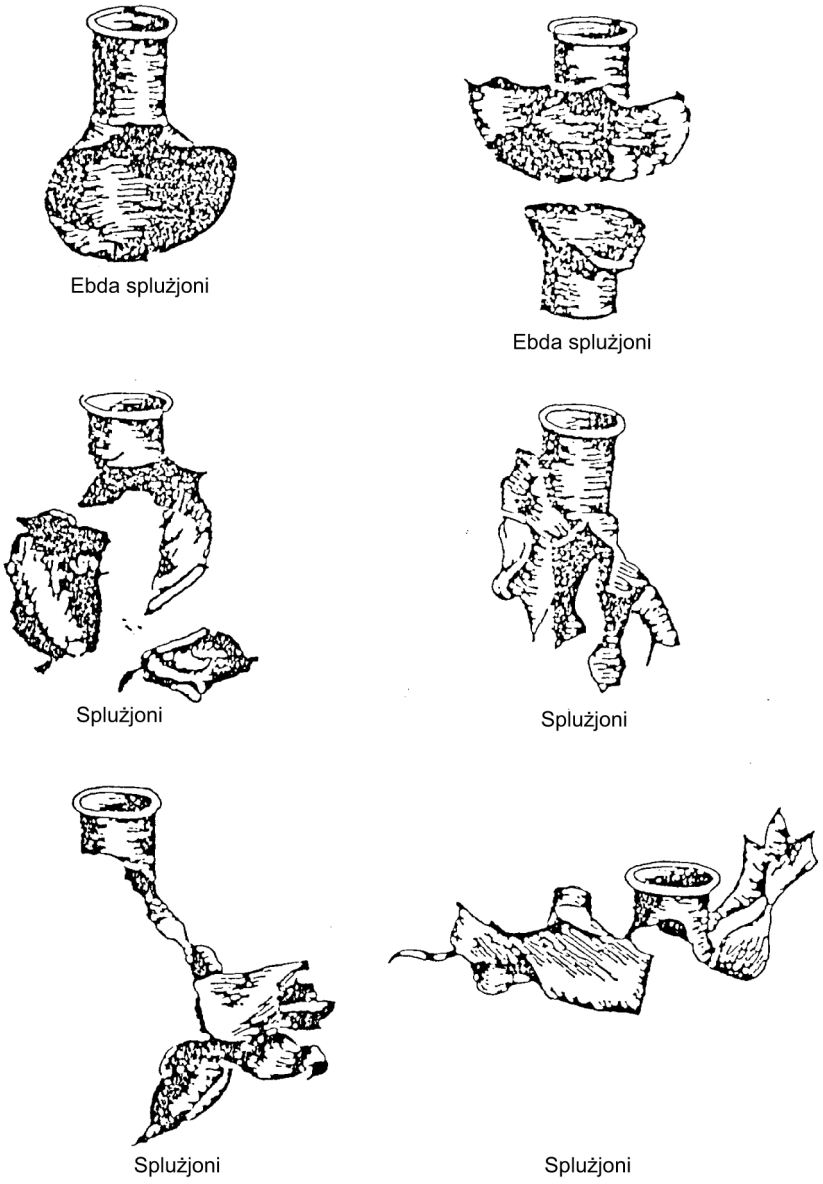
(1) tubu
(1a) flanġ ta' barra
(2) vit bil-kamin; ħajta bi frzzjoni żgħira
(3) pjanċa miftuħa a = dijametru ta' 2.0 jew 6.0 mm
(4) skorfina b = dijametru 10 mm
(5) superfiċje ċanfrin
(6) 2 flat għal spanner qies 41
(7) 2 flat għal spanner qies 36
(8) kaxxa li ma tinkisirx
(9) 2 vireg ta' rfid għat-tubu
(10) tubu mmuntat
(11) pożizzjoni għall-berner ta' wara; il-berners l-oħra jidhru
(12) merżuq pilota

▼B

Figura 2

Test tas-sensittività termika

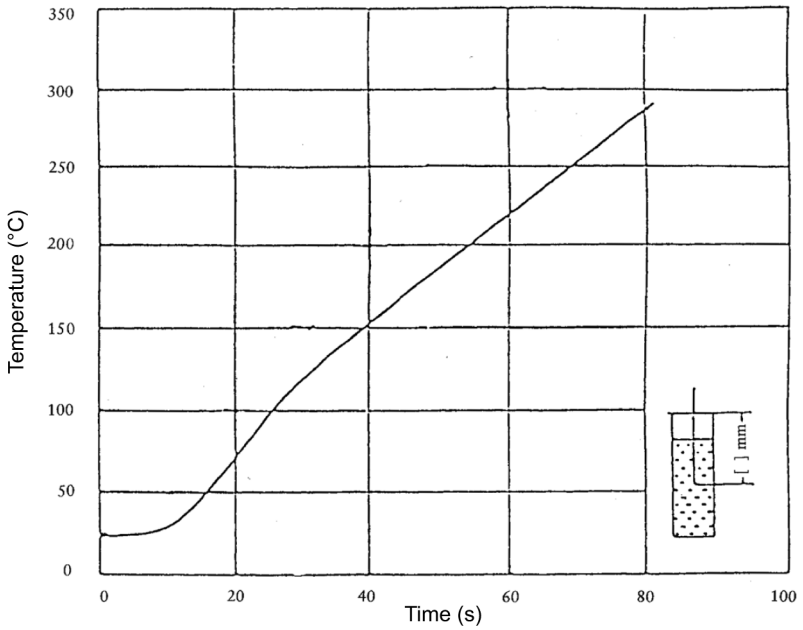
(eżempju ta' frammentazzjoni)



▼B

Figura 3

Il-kalibrazzjoni tar-rata ta' tisħin għat-test tas-sensittività termika



Il-kurvatura tat-temperatura/ħin miksuba bit-tisħin ta' *dibutyl phtalate* (27 cm^3) f'tubu magħluq (1,5 mm pjanċa mħaffra) bl-użu ta' rata ta' fluss tal-propan ta' 3,2 litru/minuta. It-temperatura tiġi mkejla b'termokoppja ta' azzar li ma jissaddadx miksi b'*chromel/alumel* ta' 1mm dijametru, impoġġija fiċ-ċentru 43 mm taħt ix-xifer tat-tubu. Ir-rata tat-tisħin bejn 135 °C u 285 °C għandha tkun bejn 185 u 215 K/minuta.

▼B

Figura 4

Apparat għat-test bix-xokk

(i-dimensjonijiet huma kollha f'millimetri)

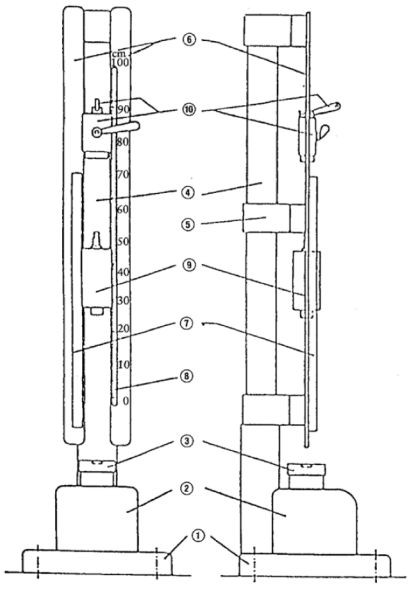


Fig 4a martell li jaqa', id-dehra ġenerali ta' quddiem u tal-ġenb

(1) baži, 450 x 450 x 60
(2) blokka ta' l-azzar, 230 x 250 x 200
(3) inkwina, 100 dijametru x 70
(4) kolonna
(5) angolu li jsaħħaħ medjan
(6) 2 gwidi
(7) ingranaġġ bis-snien

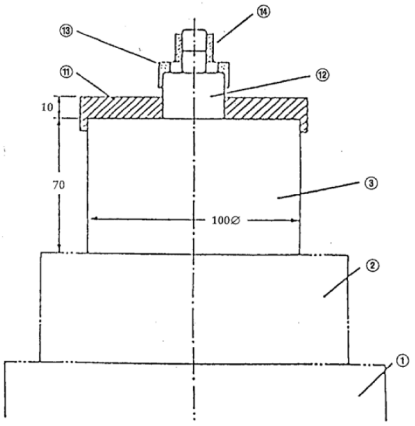


Fig 4b Martell li jaqa', il-parti t'isfel

(8) skala ggradata
(9) martell li jaqa' (piż li jaqa')
(10) apparat li jżomm u jeħles
(11) pjanċa li torbot
(12) inkwina intermedjarja (li tinbidel), 26 dijametru x 26
(13) ħolqa li torbot bit-toqob
(14) apparat għall-impatt

▼B

Figura 4

Kontinwazzjoni

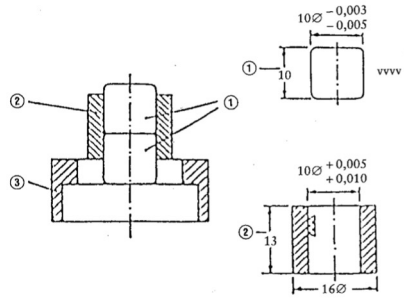


Fig. 4c Apparat tax-xokk għal sustanzi forma ta' trab jew pejst

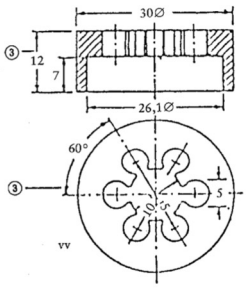
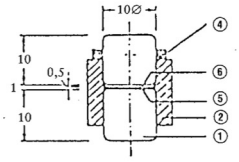


Fig 4d. Apparat tax-xokk għal sustanzi likwidi

(1) ċilindri ta' l-azzar
(2) ħolqa gwida għaċ-ċilindri ta' l-azzar
(3) ħolqa li torbot b'fetħiet
(a) taqsima vertikali
(b) pjan
(4) ħolqa tal-lastiku
(5) sustanza likwida (40 mm^3)
(6) space free from liquid



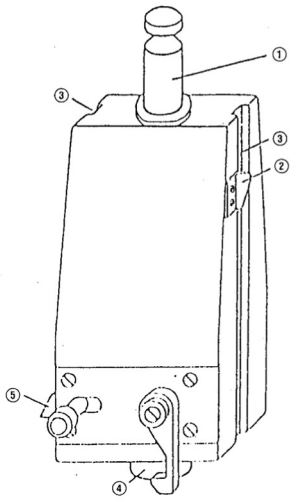


Fig. 4e Martell (piż li jaqa' ta' 5 kg)

(1) plagg għas-sospensjoni
(2) werrej ta' l-għoli
(3) groove għall-pożizzjoni
(4) ras ċilindrika għad-daqqa
(5) molla li treġġa' lura

▼B

Figura 5

Apparat għas-sensittività tal-frizzjoni.

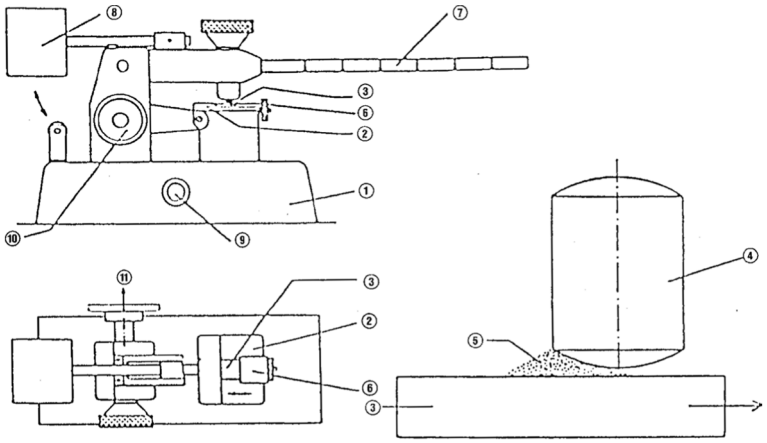


Fig 5a. Apparat ta'frizzjoni; elevazzjoni u veduta mill-ġenb

(1) bażi ta' l-azzar
(2) kerìġ li terfa' u timxi
(3) pjanċa tal-porċellana, 25 × 25 × 5 mm fuq il-kerìġ
(4) ċilindru fiss tal-porċellana 10 dijametru × 15 mm

Fig 5b Pożizzjoni tal-bidu taċ-ċilindru fuq il-kampjun

(5) il-kampjun għat-test, approssimattivament 10 mm^3
(6) apparat li jżomm iċ-ċilindru
(7) driegħ li jgħafas
(8) kontrapiż
(9) swiċċ
(10) rota biex tissettja l-kerìġ fil-pożizzjoni tal-bidu
(11) direzzjoni lejn il-mutur ta' l-elettriku

▼B

A.15. TEMPERATURA TA' AWTO-FJAMMABILITÀ (LIKWIDI U GASSIJIET)

1. METODU

1.1. DAĦLA

Sustanzi esploživi u sustanzi li jaqbdu spontanjament f'kuntatt ma' l-arja f'temperatura ambjentali m'għandhomx ikunu sottomessi għal dan it-test. Il-proċedura tat-test hija applikabbli għal gassijiet, likwidi u fwawar li, fil-preżenza ta' l-arja, jistgħu jitqabbdu b'superfiċje sħuna.

It-temperatura ta' l-awto-fjammabilità tista' titqies imnaqqsa b'mod konsiderevoli bil-preżenza ta' impuritajiet katalitiċi, b'materjal tas-superfiċje u b'volum akbar tar-reċipjent tat-test.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Il-grad ta' l-awto-fjammabilità huwa espress f'termini ta' temperatura ta' awto-fjammabilità. It-temperatura ta' l-awto-fjammabilità hija l-inqas temperatura li fiha s-sustanza għat-test taqbad meta mħallta ma' l-arja taħt kondizzjonijiet imfissra fil-metodu tat-test.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza huma ċitati fl-istandards (ara 1.6.3.). Huma għandhom iservu primarjament biex jiċċekkjaw ir-rendiment tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu tqabbil ma' riżultati minn metodi oħra.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Il-metodu jiddetermina t-temperatura minima tal-qoxra ta' ġewwa ta' reċipjent magħluq li tirriżulta fil-fjammabilità ta' gass, fwar jew likwidu injettat fir-reċipjent.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ir-ripetibbilità tvarja skond l-iskala ta' l-awto-fjammabilità u l-metodu tat-test użat.

Is-sensittività u l-ispeċifiċità jiddependu fuq il-metodu tat-test użat.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Apparat**

L-apparat huwa mfisser fil-metodu riferut f'1.6.3.

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

Kampjun tas-sustanza tat-test jiġi ttestjat skond il-metodu msemmi f'1.6.3.

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

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

▼B

2. **DATA**

Irreġistra t-temperatura tat-test, il-pressjoni atmosferika, il-kwantità użata mill-kampjun u l-intervall ta' ħin sakemm issir il-fjammabilità.

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impuritajiet),

— il-kwantità ta' kampjun użata, il-pressjoni atmosferika,

— l-apparat użat,

— ir-riżultat tal-kejl (temperaturi tat-test, riżultati li jirrigwardaw il-fjammabilità, u l-intervalli ta' ħin korrispondenti),

— ir-rimarki addizzjonali kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

Xejn.

▼B

A.16. **TEMPERATURA TA' AWTO-FJAMMABILITÀ RELATTIVA GĦAL SOLIDI**

1. **METODU**

1.1 DAĦLA

Sustanzi esplożivi u sustanzi li jaqbdu spontanjament f'kuntatt ma' l-arja f'temperatura ambjentali m'għandhomx ikunu sottomessi għal dan it-test.

L-għan ta' dan it-test huwa li jipprovdi informazzjoni preliminari dwar l-awto-fjammabilità ta' sustanzi solidi f'temperaturi elevati.

Jekk is-sħana li tiżviluppa jew b'reazzjoni tas-sustanza ma' l-ossiġenu jew b'dekompożizzjoni eżotermika ma tintilifx malajr biżżejjed fil-madwar, iseħħ awto-tisħin li jwassal għall-awto-fjammabilità. Awto-fjammabilità għalhekk isseħħ meta r-rata ta' produzzjoni tas-sħana taqbeż ir-rata tat-telf tas-sħana.

Il-proċedura tat-test hija utli bħala test ta' skrinjar preliminari għal sustanzi solidi. Minħabba n-natura komplessa tal-fjammabilità u l-kombustjoni ta' solidi, it-temperatura ta' l-awto-fjammabilità ddeterminata skond dan il-metodu ta' test għandha tintuża għal għanijiet ta' tqabbil biss.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

It-temperatura ta' awto-fjammabilità kif miksuba b'dan il-metodu hija t-temperatura ambjentali minima espressa f' ^{o}C li fiha ċertu volum ta' sustanza jaqbad taħt kondizzjonijiet definiti.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Ċertu volum tas-sustanza għat-test jitpoġġa f'forn f'temperatura ambjentali; il-kurva tat-temperatura/ħin relatata mal-kondizzjonijiet f'nofs il-kampjun tiġi rreġistrata waqt li t-temperatura tal-forn tiżdied sa 400 ^{o}C, jew sal-punt tat-tidwib jekk dan huwa iżgħar, b'rata ta' 0,5 ^{o}C/min. Għall-għan ta' dan it-test, it-temperatura tal-forn li fiha t-temperatura tal-kampjun tilħaq 400 C b'awto-tisħin tissejjaħ it-temperatura ta' l-awto-fjammabilità.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Apparat**

1.6.1.1. *Forn*

Forn tal-laboratorju pprogrammat b'temperatura (volum ta' madwar 2 litri) mgħammar b'ċirkolazzjoni ta' l-arja naturali u bi sfog għal splużjoni. Bil-għan li jkun evitat ir-riskju ta' splużjoni potenzjali, kwalunkwe gassijiet ta' dekompożizzjoni m'għandhomx jitħallew jagħmlu kuntatt ma' l-elementi elettriċi tat-tisħin.

▼B

1.6.1.2. *Kubu b'xibka tal-wajer irqiq*

Biċċa xibka tal-wajer irqiqa ta' l-azzar li ma jissaddadx b'fetħiet ta' 0,045 mm għandha tinqata' skond id-disinn f'figura 1. Ix-xibka għandha tintewa u tintrabat b'wajer f'forma ta' kubu bil-parti ta' fuq miftuħa.

1.6.1.3. *Termokoppji*

Termokoppji adattati.

1.6.1.4. *Rekorder*

Kwalunkwe rekorder b'żewġ kanali kkalibrati minn 0 sa 600 °C jew vultaġġ korrispondenti.

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

Is-sustanzi jiġu ttestjati kif riċevuti.

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

Il-kubu jimtela bis-sustanza għat-test u jittaptap bil-mod, u tiżdied aktar sustanza sakemm il-kubu jkun mimli kompletament. Il-kubu mbagħad jiġi sospiż fiċ-ċentru tal-forn f'temperatura ambjentali. Termokoppja titpoġġa fiċ-ċentru tal-kubu u oħra bejn il-kubu u l-ġenb tal-forn biex tirreġistra t-temperatura tal-forn.

It-temperaturi tal-forn u tal-kampjun jiġu rreġistrati kontinwament waqt li t-temperatura tal-forn tiġi miżjuda għal 400 C, jew għat-temperatura tat-tidwib jekk din tkun iżgħar, bir-rata ta' 0,5 °C/min.

Meta s-sustanza tqabbad it-termokoppja kampjun turi żieda qawwija fit-temperatura ogħla mit-temperatura tal-forn.

2. **DATA**

It-temperatura tal-forn li fiha t-temperatura kampjun tilħaq l-400 °C b'awto-tisħin hija relevanti għal valutazzjoni (ara figura 2).

3. **RAPPURTAR**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— deskrizzjoni tas-sustanza għat-test,

— ir-riżultati tal-kejl inkluża l-kurva tat-temperatura/ħin,

— ir-rimarki addizzjonali kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

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

▼B

Figura 1

Disinn ta' kubu tat-test ta' 20 mm

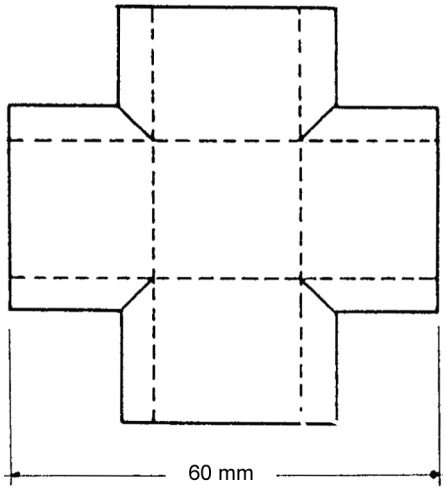
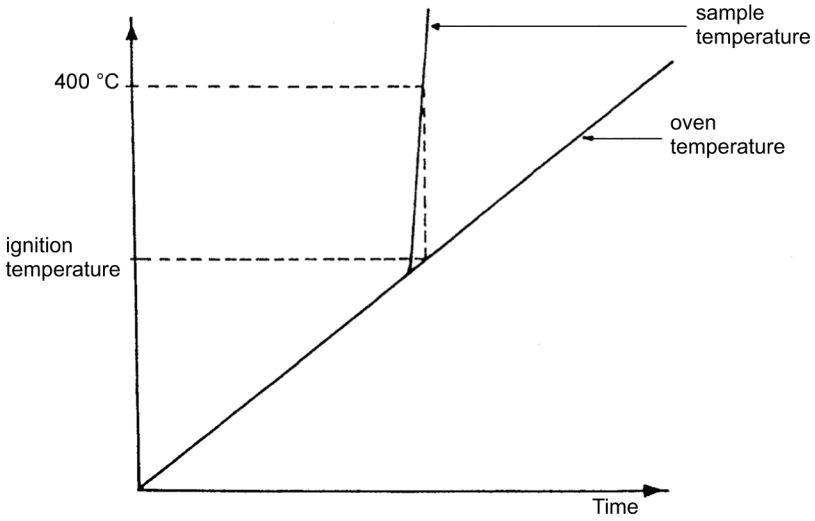


Figura 2

Kurva tipika tat-temperatura/ħin



▼B

A.17. **PROPRJETAJIET OSSIDANTI (SOLIDI)**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

Huwa utli li jkun hemm informazzjoni preliminari dwar proprjetajiet esplożivi potenzjali tas-sustanza qabel jitwettaq dan it-test.

Dan it-test mhuwiex applikabbli għal likwidi, gassijiet, sustanza fjammabbli jew esplożivi ħafna, jew perrossidi organiċi.

Dan it-test jista' ma jsirx meta eżami tal-formula strutturali jistabbilixxi mingħajr ebda dubju raġjonevoli li s-sustanza mhijiex kapaċi li tirreaġixxi eżotermikament ma' materjal kombustibbli.

Bil-għan li jkun żgurat jekk it-test għandux jitwettaq bi prekawzjonijiet speċjali, għandu jitwettaq test preliminari.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Ħin tal-kombustjoni: żmien ta' reazzjoni, f'sekondi, meħud għażżona ta' reazzjoni biex timxi mal-gozz, wara l-proċedura mfissra f'1.6.

Rata ta' kombustjoni: espressa f'millimetri għal kull sekonda.

Rata massima ta' kombustjoni: l-ogħla valur ta' rati ta' kombustjoni miksuba b'taħlitiet li jinkludu minn 10 sa 90 % bil-piż ta' ossidant.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Nitrat tal-barju (grad analitiku) huwa użat bħala sustanza ta' referenza għat-test u t-test preliminari.

It-taħlita ta' referenza hija dik it-taħlita ta' nitrat tal-barju b'ċelluloża f'forma ta' trab, ippreparat skond 1.6, li għandu rata ta' kombustjoni massima (is-soltu taħlita b'60 % nitrat tal-barju bil-piż).

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Test preliminari jitwettaq fl-interess tas-sikurezza. Ma jkunx meħtieġ aktar ittestjar meta t-test preliminari jindika b'mod ċar li s-sustanza għat-test għandha proprjetajiet ossidanti. Meta dan mhuwiex il-każ, is-sustanza mbagħad għandha tkun soġġetta għat-test sħiħ.

Fit-test sħiħ, is-sustanza għat-test u sustanza kombustibbli definita tiġi mħallta fi proporzjonijiet diversi. Kull taħlita mbagħad tiġi ffurmata f'gozz u l-gozz jitqabbad f'tarf minnu. Ir-rata ta' kombustjoni massima ddeterminata titqabbel mar-rata ta' kombustjoni massima tat-taħlita ta' referenza.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Jekk ikun meħtieġ, kwalunkwe metodu ta' ħin u taħlit huwa validu bil-kondizzjoni li d-differenza fir-rata ta' kombustjoni massima fis-sitt testijiet separati tarja mill-valur medju aritmetiku b'mhux aktar minn 10 %.

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Preparazzjoni**

1.6.1.1. *Is-sustanza għat-test*

Naqqas il-kampjun għat-test għal daqs ta' partikula < 0,125 mm bl-użu tal-proċedura li ġejja: għarbel is-sustanza għat-test, iżżan il-frazzjoni li jkun baqa', irrepeti l-proċedura sakemm il-porzjon kollha għat-test tkun għaddiet mill-għarbiel.

Jista' jintuża kwalunkwe metodu ta' żżin jew ta' tgħarbil li jissodisfa l-kriterji ta' kwalità.

Qabel tiżżejja t-taħlita s-sustanza titnixxef f'105 °C, sakemm jinkiseb il-piż kostanti. Jekk it-temperatura ta' dekompożizzjoni tas-sustanza għat-test hija taħt il-105 °C, is-sustanza għandha titnixxef b'temperatura adattata iktar baxxa.

1.6.1.2. *Sustanza kombustibbli*

Ċelluloża f'forma ta' trab hija użata bħala sustanza kombustibbli. Iċ-ċelluloża għandha tkun tat-tip użata għal kromatografija ta' saff irqiq jew għal kromatograija tal-kolonna. Waħda tat-tip b'fibri ta' tul ta' aktar minn 85 % bejn 0,020 u 0,075 mm instabu li kienu adattati. It-trab taċ-ċelluloża jiġi mgħoddi minn għarbiel b'toqob ta' daqs ta' 0,125 mm. L-istess lott ta' ċelluloża għandu jintuża matul it-test.

Qabel tiżżejja t-taħlita, iċ-ċelluloża f'forma ta' trab titnixxef f'105 °C, sakemm jinkiseb piż kostanti.

Jekk tintuża ċ-ċana ta' l-injam fit-test preliminari, allura pprepara ċ-ċana ta' l-injam artab billi tiġbor il-porzjon li tgħaddi minn għarbiel b'toqob ta' 1,6 mm, ħallat sewwa, imbagħad nixxef f'105 °C għal erba' sigħat f'saff ta' mhux oħxon aktar minn 25 mm. Kessaħ u aħżen f'kontenitur li fih ma jidħolx arja mimli kemm sa kemm huwa prattiku u sakemm ikun meħtieġ, preferibbilment fi żmien 24 siegħa mit-tnixxif.

1.6.1.3. *Għajn ta' fjammabiltà*

Fjamma taħraq minn berner tal-gass (dijametru minimu ta' 5 mm) għandha tintuża bħala l-għajn ta' fjammabilità. Jekk tintuża għajn ta' fjammabbiltà oħra (eż. meta jsir it-test f'atmosfera inerta), id-deskrizzjoni u l-ġustifikazzjoni għandhom ikunu rrapurtati.

1.6.2. **L-eżekuzzjoni tat-test**

Nota:

Taħlitiet ta' ossidaturi ma' ċelluloża jew ċana ta' l-injam iridu jkunu ttrattati bħala potenzjalment splussivi u mmaniġġjati b'attenzjoni xierqa.

1.6.2.1. *Test preliminari*

Is-sustanza mnixxfa hija mħallta sewwa ma' ċelluloża mnixxfa jew ċana ta' l-injam fil-proporzjonijiet ta' 2 ta' sustanza għat-test għal 1 ta' ċelluloża jew ċana ta' l-injam bil-piż u t-taħlita tiġi ffurmata f'gozz żgħir forma ta' kon ta' dimensjonijiet 3,5 cm (dijametru tal-bażi) x 2,5 cm (għoli) pemezz tal-mili, mingħajr rass, ta' oġġett li jifforma kon (eż. lembut tal-ħġieġ tal-laboratorju biż-żennuna magħluqa).

▼B

Il-gozz jitpoġġa fuq pjanċa tal-baži li mhijiex kombustibbli, mhux poruża u b'konduttività baxxa ta' sħana. It-test għandu jitwettaq f'armarju tad-duħħan bħal f'1.6.2.2.

L-għajn tal-fjammabbiltà jitressaq f'kuntatt mal-kon. Is-saħħa u d-dewmien tar-reazzjoni riżultanti għandhom ikunu osservati u rreġistrati.

Is-sustanza għandha tkun ikkunsidrata bħala ossidanti jekk ir-reazzjoni hija qawwija.

Fi kwalunkwe każ fejn ir-riżultat huwa dubjuż, imbagħad ikun neċessarju li jsir it-test kollu mfisser hawn taħt.

1.6.2.2. *It-test tas-serje*

Ipprepara taħlitiet ta' ossidatur ċelluloża li jkun fihom minn 10 sa 90 % piż ta' ossidatur f'żidiet ta' 10 %. F'każijiet li kważi qegħdin fl-istess limiti, taħlitiet ta' ossidatur ċelluloża intermedji għandhom jintużaw biex tinkiseb ir-rata ta' fjammabbiltà massima b'aktar preċiżjoni.

Il-gozz ikun iffurmat permezz ta' forma. Din il-forma magħmula mill-metall, għandha tul ta' 250 mm b'taqsima trasversali trijangulari ta' għoli intern ta' 10 mm u wisa' interna ta' 20 mm. Żewġ pjanċi tal-metall jiġu mmuntati fuq iż-żewġ naħat tal-forma f'direzzjoni longitudinali bħala limitazzjonijiet laterali li joħorġu 2 mm "il barra mit-tarf l-għoli tat-taqsima trasversali trijangulari (figura). Dan l-arranġament jimtela liberament bi ftit taħlita żejda. Wara li l-forma tintefa" għal darba waħda minn għoli ta' 2 cm fuq superfiċje solida, is-sustanza żejda li tibqa' titneħħa b'karta milwija. Il-limitazzjonijiet laterali jitneħħew u t-trab li jibqa' jiħi ċċattjat, permezz ta' romblu. Pjanċa ta' baži mhux kombustibbli, mhux poruża u b'konduttività ta' sħana baxxa mbagħad titpoġġa fuq il-forma, l-apparat jinqaleb u l-forma titneħħa.

Irranġa l-gozz fil-kurrent ta' l-arja f'armarju li jiġbed id-duħħan.

Il-veloċità ta' l-arja trid tkun suffiċjenti biex tevita li d-duħħan joħroġ fil-laboratorju u m'għandhiex tkun varjata matul it-test. L-apparat irid ikun protett mill-kurrent ta' l-arja.

Minħabba l-igroskopiċità taċ-ċelluloża u ta' whud mis-sustanzi għat-test, it-test għandu jitwettaq malajr kemm jista' jkun.

Qabbad ġenb wieħed tal-gozz billi tressqu mal-fjamma.

Kejjel il-ħin tar-reazzjoni fuq distanza ta' 200 mm wara li ż-żona ta' reazzjoni tinfirex sa distanza inizjali ta' 30 mm.

It-test jitwettaq bis-sustanza ta' referenza u ta' l-inqas darba b'kull waħda mill-firxa ta' taħlitiet tas-sustanza għat-test maċ-ċelluloża.

Jekk ir-rata ta' fjammabilità massima tinsab li hija akbar b'mod sinifikanti minn dik tat-taħlita ta' referenza, it-test jista' jitwaqqaf; inkella t-test għandu jkun ripetut għal ħames darbiet għal kull waħda mit-tliet taħlitiet li jagħtu l-aktar rata veloċi ta' fjammabilità.

▼B

Jekk hemm suspett li r-riżultat huwa pożittiv falz, allura t-test għandu jkun ripetut bl-użu ta' sustanza inerta bl-istess daqs ta' partikula, bħall-*kieselguhr*, flok iċ-ċelluloża. Alternattivament, it-taħlita tas-sustanza għat-test maċ-ċelluloża, li għandha l-aktar rata veloċi ta' fjammabilità, għandha tkun ittestjata mill-ġdid f'atmosfera inerta (< 2 % v/v kontenut ta' ossiġnu).

2. **DATA**

Għal raġunijiet ta' sikurezza r-rata ta' fjammabilità massima – mhux il-valur medju – għandha tkun ikkunsidrata bħala l-proprjetà ossidanti karatteristika tas-sustanza għat-test.

L-ogħla valur tar-rata tal-fjammabilità f'serje ta' sitt testijiet ta' taħlita definita huwa relevanti għall-valutazzjoni.

Piniġi graff ta' l-ogħla valur tar-rata tal-fjammabilità għal kull taħlita kontra l-konċentrazzjoni ta' l-ossidatur. Mill-graff ħu r-rata tal-fjammabilità massima.

Is-sitt valuri mkejla tar-rata tal-fjammabilità f'serje miksuba mit-taħlita mar-rata ta' fjammabilità massima ma tridx tiddiferenzja mill-valur medju aritmetiku b'aktar minn 10 %; inkella l-metodi tat-tħin u t-taħlit jridu jittejbu.

Qabbel ir-rata ta' fjammabilità massima miksuba mar-rata ta' fjammabilità massima tat-taħlita ta' referenza (ara 1.3).

Jekk it-testijiet jitwettqu f'atmosfera inerta, ir-rata ta' reazzjoni massima titqabbel ma' dik tat-taħlita ta' referenza f'atmosfera inerta.

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-identità, il-kompożizzjoni, il-purità, il-kontenut ta' umdità eċċ. tas-sustanza ttestjata;

— kwalunkwe trattament tal-kampjun għat-test (eż. tħin, tnixxif);

— l-għajn tal-fjammabbiltà użata fit-testijiet;

— ir-riżultati tal-kejl;

— il-mod ta' reazzjoni (eż. fjammabilità lelliexa fuq is-superfiċje, fjammabilità tul il-massa kollha, kwalunkwe informazzjoni li tirrgwarda l-prodotti ta' kombustjoni, ...);

— ir-rimarki rilevanti kollha għall-interpretazzjoni tar-riżultati, inkluża deskrizzjoni ta' l-enerġija fiżika (fjamma, spark, duħħan, ħruq bil-mod sakemm isir faħam, eċċ.) u t-tul ta' żmien approssimattiv prodott fit-test preliminari tas-sikurezza/skrinjar kemm għas-sustanza għat-test kif ukoll għal dik ta' referenza;

— ir-riżultati minn testijiet b'sustanza inerta, jekk hemm;

— ir-riżultati minn testijiet f'atmosfera inerta, jekk hemm.

▼B

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Sustanza titqies li hija sustanza ossidanti meta:

(a) fit-test preliminari, hemm reazzjoni vigoruża;

(b) fit-test sħiħ, ir-rata ta' fjammabilità massima tat-taħlitiet ittestjati hija ogħla minn jew ugwali għar-rata ta' fjammabilità massima tat-taħlita ta' referenza taċ-ċelluloża u n-nitrat tal-barju.

Bil-għan li jkun evitat pożittiv falz, ir-riżultati miksuba meta s-sustanza għat-test titħallat ma' materjal inert u/jew meta jsir l-ittestjar taħt atmosfera inerta, għandhom jiġu kkunsidrati wkoll fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

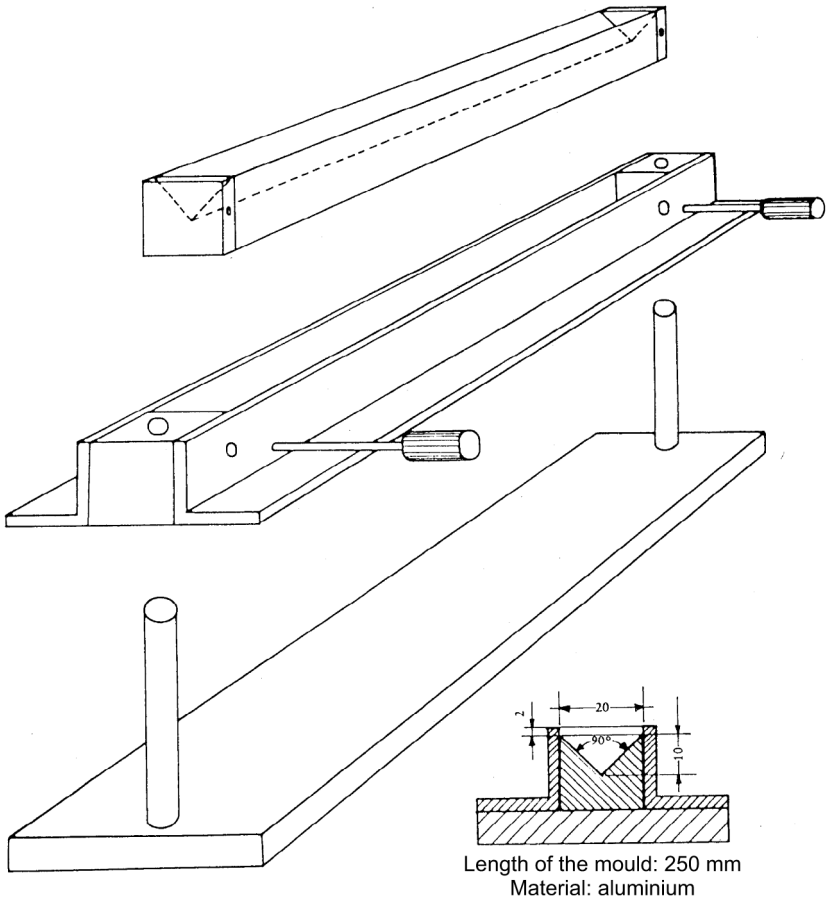
▼B

Appendiċi

Figura

Forma u aċċessorji għall-preparazzjoni tal-gozz

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



▼B

A.18. **IL-MEDJA TAL-PIŻ MOLEKULARI TAN-NUMRU U D-DISTRIBUZZJONI TAL-PIŻ MOLEKULARI TAL-POLIMERI**

1. **METODU**

Dan il-metodu Kromotografiku bil-Permeazzjoni tal-Ġel huwa replika tal-OECD TG 118 (1996). Il-prinċipji fundamentali u aktar informazzjoni teknika jinsabu fir-referenza 1.

1.1. DAĦLA

Ladarba l-proprjetajiet tal-polimeri huma daqshekk differenti, huwa impossibbli li jiġi deskritt metodu wieħed li jagħti l-kondizzjonijiet preċiżi għas-separazzjoni u l-valutazzjoni li japplikaw għal kull sitwazzjoni u għal kull ħaġa li tiġri waqt is-separazzjoni tal-polimeri. Partikolarment u ta' spiss, sistemi ta' polimeri komplessi mhumiex soġġetti għall-kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel (GPC). Meta l-GPC mhuwiex prattikabbli, l-piż molekulari jista' jiġi deċiż b'metodi oħrajn (ara l-Anness). F'dawn il-każijiet, għandhom jingħataw id-dettalji u l-ġustifikazzjonijiet kollha għall-metodu użat.

Il-metodu deskritt huwa bbażat fuq l-istandard DIN 55671 (1). F'dan l-istandard DIN tinsab informazzjoni dettaljata fuq kif għandhom jitmexxew dawn l-esperimenti u kif għandha tiġi vvalutata d-DATA. F'każ illi hemm bżonn li l-kondizzjonijiet ta' l-esperiment jinbidlu, dawn il-bidliet iridu jiġu ġustifikati. Jistgħu jintużaw standards oħrajn jekk ikun hemm ir-referenzi kollha. Il-metodu deskritt juża kampjuni tal-polisterin ta' politixrid magħruf għall-kalibrazzjoni, u jista' jagħti l-każ li jrid jiġi modifikat biex jaqbel ma' ċerti polimeri, eż. polimeri li jinħallu fl-ilma u polimeri *long-chain branched.*

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Il-medja tal-piż molekulari tan-numru M_n u l-medja tal-piż molekulari tal-piż M_w huma ddeterminati skond l-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

fejn,

H_i huwa l-livell tas-sinjal ta' osservazzjoni mil-linja ta' bażi għall-volum ta' retenzjoni V_i,

M_i huwa l-piż molekulari tal-frazzjoni tal-polimeri fil-volum ta' retenzjoni V_i, u

n huwa n-numru tal-punti ta' DATA.

Il-wisa' tad-distribuzzjoni tal-piż molekulari, li hija miżura tat-tixrid tas-sistema, tingħata bil-proporzjon M_w/M_n.

▼B

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Ladarba l-GPC huwa metodu relattiv, hemm bżonn ta' kalibrazzjoni. Normalment jintużaw standards tal-polistiren b'distribuzzjoni limitata u mibnija linearment u li għandhom piż molekulari medju M_n u M_w u distribuzzjoni ta' piż molekolari magħrufa. Il-kurva tal-kalibrazzjoni tista' tintuża biss fid-determinazzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun mhux magħruf jekk il-kondizzjonijiet għas-separazzjoni tal-kampjun u l-istandards intgħażlu b'mod preċiżament l-istess.

Ir-relazzjoni ddeterminata bejn il-piż molekulari u l-volum ta' eluzjoni huwa validu biss taħt il-kondizzjonijiet speċifiċi ta' l-esperiment partikolari. Il-kondizzjonijiet fuq kollox jinkludu t-temperatura, s-solvent (jew taħlita tas-solventi), il-kondizzjonijiet tal-kromatografija u l-kolonna tas-separazzjoni jew is-sistemi tal-kolonni.

Il-piż molekulari tal-kampjuni ddeterminati b'dan il-mod huma valuri relattivi u huma deskritti bħala "piżijiet molekulari ekwivalenti għall-polistiren". Dan ifisser illi skond id-differenzi strutturali u kimiċi bejn il-kampjun u l-istandards, il-piżijiet molekulari jistgħu jiddevjaw mill-valuri assoluti sa grad iktar jew inqas. Jekk jintużaw standards oħrajn, eż. il-glikol tal-polietilin, l-ossidu tal-politin, il-metakrilat tal-polimetil, aċidu poliakriliku, għandha titniżżel ir-raġuni.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-EŻAMI

Kemm id-distribuzzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun kif ukoll il-piżijiet molekulari medji (M_n, M_w) jistgħu jiġu ddeterminati billi jintuża l-GPC. Il-GPC huwa metodu speċjali ta' kromatografija likwida fejn il-kampjun jiġi separat skond il-valuri idrodinamiċi tal-kostitwenti individwali (2).

Is-separazzjoni ssir kif il-kampjun jgħaddi minn ġo kolonna mimlija b'materjal poruż, tipikament ġel organiku. Molekoli żgħar jistgħu jippenetraw il-pori filwaqt li l-molekoli kbar ma jistgħux. Il-passaġġ tal-molekoli kbar huwa, għalhekk, iqsar u għalhekk huma jippenetraw l-ewwel. Il-molekoli ta'daqs medju jippenetraw minn uħud mill-pori u jgħaddu iktar tard. L-iżgħar molekoli, b'raġġ idrodinamiku medju iżghar mill-pori tal-ġel jistgħu jippenetraw il-pori kollha. Dawn ikun eluzi l-aħħar.

Idealment, is-separazzjoni hija ddeterminata biss skond id-daqs ta' l-ispeċi tal-molekoli, imma fil-prattika huwa diffiċli li wieħed jevita xi interferenza mill-assorbiment L-ippakkjar mhux ugwali tal-kolonni u volumi mejtin jistgħu jaggravaw is-sitwazzjoni (2).

L-osservazzjoni hija effetwata minn, eż. l-indiċi refrattiv jew l-assorbiment tal-UV u tagħti kurva tad-distribuzzjoni sempliċi. Madankollu, biex il-kurva tingħata valuri attwali tal-piż molekulari, huwa neċessarju li l-kolonna tiġi kkalibrata billi polimeri ta' piż molekulari magħruf u, idealment, ta' struttura simili ħafna, jitniżżlu 'l isfel, eż. standards tal-polistiren varji. B'mod tipiku, għandha tirriżulta kurva Gaussian, xi drabi mgħawwġa minħabba denb fuq in-naħa baxxa tal-piż molekulari, fejn il-fus vertikali jindika l-kwantità, skond il-piż, ta' l-ispeċi tal-piż molekulari varji, u l-fus orizzontali l-piż molekulari rreġistrat.

▼B

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ir-ripetibilità (Devjazzjoni ta' Livell Stabbilit: RSD) tal-volum ta' l-elużjoni għandha tkun aħjar minn 0,3 %. Ir-ripetibilità mixtieqa ta' l-analiżi għandha tiġi żgurata permezz ta' korrezzjoni skond standard intern jekk kromatogram huwa evalwat b'mod li huwa dipendenti fuq il-ħin u ma jaqbilx mal-kriterju msemmi hawn fuq (1). Il-politixrid jiddependi fuq il-piżijiet molekulari ta' l-istandards. Fil-każ ta' standards tal-polistirene, valuri tipiċi huma:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p huwa l-piż molekulari ta' l-istandard fil-quċċata tal-massimu)

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' L-EŻAMI

1.6.1. **Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet standard tal-polistiren**

L-istandards tal-polistiren għandhom jinħallu billi jitħalltu b'attenzjoni fl-eluwent magħżul. Ir-rakkomandazzjonijiet tal-fabbrikant għandhom jiġu kkunsidrati waqt il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet.

Il-konċentrazzjonijiet ta' l-istandards magħżula jiddependu fuq diversi fatturi: eż. il-volum ta' l-injezzjoni, il-viskożità tas-soluzzjoni u s-sensittività tad-ditekter analitiku. Il-volum massimu ta' l-injezzjoni għandu jiġi adattat għat-tul tal-kolonna biex tiġi evitata tagħbija żejda. Volumi ta' injezzjoni tipiċi għas-separazzjonijiet analitiċi bl-użu tal-GPC b'kolonna ta' 30 cm × 7,8 mm huma normalment bejn 40 u 100 µl. Volumi ogħla huma possibbli, imma m'għandhomx jaqbu 250 µl. L-aħjar proporzjon ta' bejn il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni għandha tiġi ddeterminata qabel ma tiġi kkalibrata l-kolonna.

1.6.2. **Preparazzjoni tal-kampjun tas-soluzzjoni**

Fil-prinċipju, l-istess ħtiġijiet japplikaw għall-preparazzjoni tal-kampjuni tas-soluzzjonijiet. Il-kampjun għandu jinħall f'solvent xieraq, eż. it-tetraidrofuran (THF), billi jitħawwad bil-galbu. Taħt l-ebda ċirkostanza m'għandu jinħall permezz ta' banju ultrasoniku. Fejn huwa neċessarju, il-kampjun tas-soluzzjoni għandu jiġi ppurifikat permezz ta' filtru tal-membrana b'pori ta' daqs bejn 0,2 u 2 µm.

Il-preżenza ta' partikoli li ma nħallux għanda titniżżel fir-rapport finali għar-raġuni li dawn jistgħu jirriżultaw minn speċi ta' piż molekulari għoli. Għandu jintuża metodu xieraq biex jiġi ddeterminat il-perċentaġġ skond il-piż tal-partikoli li nħallu. Is-soluzzjonijiet għandhom jintużaw fi żmien 24 siegħa.

1.6.3. **L-apparat**

— ġibjuni tas-solventi:

— *degasser* (fejn xieraq),

— pompa

▼B

— apparat biex inaqqas l-impuls (fejn hemm bżonn)

— sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tal-kromatografija,

— ditekter

— *flowmeter* (fejn hemm bżonn),

— proċessur li jirrekordja d-DATA,

— kontenitur għall-iskart

Għandu jiġi żgurat li s-sistema GPC hija inerta fir-rigward tas-solventi użati (eż. bl-użu ta' kapillari ta' l-azzar għas-solvent THF).

1.6.4. **L-injezzjoni u s-sistema li twassal s-solventi**

Volum definit tal-kampjun tas-soluzzjoni jitgħabba fuq il-kolonna bl-użu ta' *auto-sampler* jew manwalment f'żona definita preċiżament. L-irtirar jew l-għafis tal-*plunger* tas-siringa b'mod mgħaġġel, jekk isir manwalment, jista' jikkawża bidliet fid-distribuzzjoni tal-piż molekulari osservata. Is-sistema tat-twassil tas-solvent għandha, safejn huwa possibbli, tkun ħielsa mill-impulsi u idealment għandha tinkludi apparat li jnaqqas l-impulsi. Il-*flowrate* tkun madwar 1 ml/min.

1.6.5. **Il-kolonna**

Skond il-kampjun, il-polimer ikun karatterizzat mill-użu ta' kolonna sempliċi jew minn numru ta' kolonni konnessi f'sekwenza. Għadd ta' materjali poruż tal-kolonni bi proprjetajiet definiti (eż. daqs tal-pori, limiti ta' esklużjoni) huma disponibbli kummerċjalment. L-għażla tal-ġel ta' separazzjoni jew tat-tul tal-kolonna jiddependi fuq il-proprjetajiet tal-kampjun (volumi idrodinamiċi, distribuzzjoni tal-piż molekulari) u l-kondizzjonijiet speċifiċi għas-separazzjoni bħas-solventi, t-temperatura u l-*flowrate* (1) (2) (3).

1.6.6. **Il-pjanċi teoretiċi**

Il-kolonna jew il-kombinazzjoni tal-kolonni użati għas-separazzjoni għandhom jiġu karatterizzati skond in-numru ta' pjanċi teoretiċi. Dan jinvolvi, f'każ meta t-THF huwa s- solvent eluwent, it-tagħbija ta' soluzzjoni ta' etile benżin jew ta' sustanza maħlula mhux b'polarità xierqa fuq kolonna ta' tul magħruf. In-numru ta' pjanċi teoretiċi huwa mogħti skond l-ekwazzjoni li ġejja:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{or} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

fejn,

N = in-numru tal-pjanċi teoretiċi

V_e = il-volum ta' elużjoni fil-quċċata tal-massimu

▼B

W = il-quċċata tal-wisa' tal-linja bażi

$W_{1/2}$ = il-quċċata tal-wisa' fin-nofs ta' l-għoli

1.6.7. **L-effiċjenza tas-separazzjoni**

Flimkien ma' l-ammont tal-pjanċi teoretiċi, li hija kwantità li tistabbilixxi il-*bandwidth*, l-effiċjenza tas-separazzjoni għandha sehem ukoll, u din hija stabbilita skond kemm hi wieqfa l-kurva tal-kalibrazzjoni. L-effiċjenza tas-separazzjoni ta' kolonna tinkisebskond ir-relazzjoni li ġejja:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

fejn,

$V_{e,\ M_x}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari M_x

$V_{e,(10.Mx)}$= il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari ta' għaxar darbiet iktar

Ir-riżoluzzjoni tas-sistema hija normalment definita kif ġej:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

fejn,

V_{e1}, V_{e2} = il-volumi ta' elużjoni taż-żewġ standards tal-polistiren fil-quċċata tal-massimu

W_1, W_2 = il-quċċata tal-wisat tal-linji ta' bażi

M_1, M_2 = il-piżijiet molekulari fil-quċċata tal-massimu (għandu jkun hemm differenza b' fattur ta' 10)

Il-valur R għas-sistema tal-kolonni għandu jkun ikbar minn 1.7 (4).

1.6.8. **Solventi**

Is-solventi kollha għandhom ikollhom purità għolja (għat-THF tintuża purità ta' 99,5 %). Id-depożitu tas-solventi (f'atmosfera ta' gass inert, jekk huwa neċessarju) għandu jkun kbir biżżejjed għall-kalibrazzjoni tal-kolonna u għal diversi analiżijiet tal-kampjuni. Il-gass għandu jitneħħa mis-solvent qabel ma jgħaddi għall-kolonna minn ġo pompa.

1.6.9. **Kontroll tat-temperatura**

It-temperatura tal-komponenti kruċjali interni (iċ-ċirku ta' injezzjoni (*injection loop*), il-kolonni, id-ditekter, u t-tubi) għandha tkun kostanti u konsistenti skond l-għażla tas-solvent.

▼B

1.6.10. **Ditekter**

Il-funzjoni tad-ditekter hija li jirreġistra b'mod kwantitattiv il-konċentrazzjoni tal-kampjun li ġie elwat mill-kolonna. Biex jiġi evitat li l-quċċati jitwessgħu, il-volum tal-*cuvette* taċ-ċellula tad-ditekter għandu jinżamm żgħir kemm jista' jkun. M'għandux ikun akbar minn 10 µl ħlief għal ditekters li jxerrdu d-dawl u għal ditekters tal-viskożità. Normalment tintuża rifrattometrija differenzjali għall-osservazzjoni. Madankollu, jekk meħtieġ mill-proprjetajiet speċifiċi tal-kampjun jew tas-solvent ta' elużjoni, jistgħu jintużaw ditekters oħrajn, eż. UV/VIS, IR, ditekters tal-viskożità, eċċ.

2. **DATA U RAPPURTAR**

2.1. DATA

L-istandard DIN (1) għandu jiġi kkonsultat għall-kriterji ta' valutazzjoni dettaljata kif ukoll għall-kondizzjonijiet għall-ġbir u għall-proċessar ta' DATA.

Għal kull kampjun għandhom isiru żewġ esperimenti indipendenti. Għandhom jiġu analizzati individwalment.

M_n, M_w, M_w/M_n u M_p għandhom jiġu pprovduti għal kull kejl. Huwa neċessarju li jiġi espliċitament indikat li l-valuri mkejla huma valuri relattivi ekwivalenti għall-piżijiet molekulari ta' l-istandard użat.

Wara li jiġu ddeterminati il-volumi ta' ritenzjoni jew il-ħinijiet ta' ritenzjoni (possibbilment irranġati permezz ta' standard intern), valuri log M_p (fejn M_p huwa l-massimu tal-quċċata ta' l-istandard tal-kalibrazzjoni) għandhom jitniżżlu ma' wieħed minn dawk il-kwantitajiet. Mill-inqas żewġ punti ta' kalibrazzjoni huma neċessarji għal kull sett ta' għaxar piżijiet molekulari, u mill-inqas ħames punti ta' kejl huma meħtieġa għall-kurva totali, u dan għandu jkopri l-piż molekulari stmat tal-kampjun. It-tarf baxx tal-kurva tal-kalibrazzjoni tal-piż molekulari huwa definit permezz ta' benżin *n-hexyl* jew sustanza maħlula mhux polari oħra.xierqa Il-medja tan-numru u l-medja tal-piż molekulari huma ġeneralment iddeterminati permezz ta' proċessar tad-DATA elettronika bbażata fuq il-formuli tas-sezzjoni 1.2. F'każ li tintuża d-diġitazzjoni manwali, ASTM D 3536-91 jista' jiġi kkonsultat (3).

Il-kurva tad-distribuzzjoni għandha tiġi pprovduta f'forma ta' tabella jew figura (frekwenza differenzjali jew persentaġġi tas-somom ma' log M). Fir-rappreżentazzjoni grafika, sett wieħed ta' għaxar piżijiet molekulari huwa normalment wiesa' 4 cm u l-massimu tal-quċċata għandu jkun twil xi 8 cm. F'każ ta' kurvi tad-distribuzzjoni integrali, d-differenza fil-koordinat bejn 0 u 100 % għandha tkun ta' xi 10 cm.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Sustanza tat-test**

— informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test (identità, addittivi, impuritajiet),

▼B

— deskrizzjoni tat-trattament tal-kampjun, osservazzjonijiet, problemi.

2.2.2. **Strumentazzjoni**

— kontenitur ta' l-eluwent, gass inert, tneħħija ta' gass żejjed ta' l-eluwent, kompożizzjoni ta' l-eluwent, impuritajiet,

— pompa, apparat li jnaqqas il-polz, sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tas-separazzjoni (il-fabbrikant, l-informazzjoni kollha dwar il-karatteristiċi tal-kolonni bħad-daqs tal-pori, it-tip ta' materjal ta' separazzjoni eċċ., in-numru, it-tul u l-ordni tal-kolonni użati),

— numru ta' pjanċi teoretiċi tal-kolonni (jew kombinazzjoni), effiċjenza tas-separazzjoni (riżoluzzjoni tas-sistema).

— informazzjoni dwar is-simetrija tal-quċċati,

— temperatura tal-kolonni, tip ta' kontroll tat-temperatura,

— indikatur (prinċipju tal-kejl, tip, *cuvette*, volum),

— *flowmeter* jekk użat (il-fabbrikant, il-prinċipju tal-kejl),

— sistema għar-reġistrazzjoni u proċessar tad-DATA (*hardware* u *software*)

2.2.3. **Kalibrazzjoni tas-sistema**

— deskrizzjoni dettaljata tal-metodu użat biex tinbena l-kurva tal-kalibrazzjoni,

— informazzjoni dwar il-kriterji ta' kwalità ta' dan il-metodu (eż. koeffiċjent tal-korrelazzjoni, *error sum of squares* eċċ.),

— informazzjoni dwar l-estrapolazzjonijiet, l-assunzjonijiet u l-approssimazzjonijiet li saru waqt il-proċedura esperimentali u l-valutazzjoni u l-proċessar tad-DATA,

— il-kejl kollu użat għall-kostruzzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni għandu jiġi dokumentat f'tabella li tinkludi l-informazzjoni li ġejja għal kull punt ta' kalibrazzjoni:

  — l-isem tal-kampjun,

  — il-fabbrikant tal-kampjun,

  — il-valuri karatteristiċi ta' l-istandards M_p, M_n, M_w u M_w/M_n, kif ipprovduti mill-fabbrikant jew kif miġjuba minn kejl sussegwenti, flimkien ma' dettalji dwar il-metodu ta' determinazzjoni,

  — il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni,

▼B

— il-valur M_p użat għall-kalibrazzjoni,

— il-valur ta' l-elużjoni jew il-ħin taż-żamma kkoreġut imkejjel fl-ogħla punt massimu,

— l-M_p kkalkulat fl-ogħla punt massimu,

— il-persentaġġ ta' żball ta' l-M_p kkalkulat u l-valur tal-kalibrazzjoni.

2.2.4. **Valutazzjoni:**

— valutazzjoni fuq bażi ta' ħin: il-metodi użati biex tkun żgurata r-riproduzzjoni meħtieġa (metodu ta' korrezzjoni, standard intern, eċċ.),

— informazzjoni dwar jekk l-istima ġietx affettwata fuq il-bażi tal-volum ta' l-elużjoni jew il-ħin taż-żamma,

— informazzjoni dwar il-limiti tal-valutazzjoni jekk quċċata mhijiex analizzata kompletament,

— deskrizzjoni ta' metodi li jneħħu x-xkiel, jekk użati,

— proċeduri ta' preparazzjoni u trattament minn qabel tal-kampjun,

— il-preżenza ta' partikoli mhux maħlulin, jekk hemm,

— il-volum ta' l-injezzjoni (µl) u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni (mg/ml),

— osservazzjonijiet li jindikaw effetti li jwasslu għal devjazzjonijiet mill-profil GPC ideali,

— deskrizzjoni dettaljata tal-modifikazzjonijiet kollha fil-proċeduri ta' l-ittestjar,

— dettalji ta' l-iskali ta' żbalji,

— kwalunkwe informazzjoni oħra u osservazzjonijiet rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati,

3. **REFERENZI**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., u Bly, D. D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Appendiċi

Eżempji ta' metodi oħra għad-determinazzjoni tal-piż numru medju molekulari (mn) għall-polimeri

Il-kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel (GPC) hija l-metodu preferut għad-determinazzjoni ta' M_n, speċjalment meta huwa disponibbli sett ta' standards, li l-istruttura tagħhom hija komparabbli ma' l-istruttura tal-polimer. Madankollu, fejn hemm diffikultajiet prattiċi fl-użu tal-GPC jew fejn diġà mistenni li s-sustanza ma tgħaddix mill-kriterju regolatorju M_n (u li jeħtieġ konferma), metodi alternattivi oħra huma disponibbli, bħal:

1. **Użu ta' Proprjetajiet Kolligativi**

1.1 Ebulljoskopija/Krijoskopija

tinvolvi l-kejl ta' l-elevazzjoni tat-temperatura tat-tgħolija (ebulljoskopija) jew id-depressjoni tat-temperatura ta' l-iffriżar (krijoskopija) ta' solvent, meta jiżdied il-polimer. Il-metodu huwa bbażat fuq il-fatt li l-effett tal-polimer maħlul fuq it-temperatura tat-tgħolija/ta' l-iffriżar tal-likwidu jiddependi fuq il-piż molekulari tal-polimer (1)(2).

Applikabilità, $M_n < 20\,000$.

1.2 Tbaxxija tal-Pressjoni tal-Fwar

tinvolvi l-kejl tal-pressjoni tal-fwar minn likwidu ta' referenza magħżul qabel u wara ż-żieda ta' kwantitajiet magħrufa ta' polimer (1)(2).

Applikabilità, $M_n < 20\,000$ (teoretikament; iżda fil-prattika ta' valur limitat).

1.3 L-Ożmometrija tal-Membrana

hija bbażata fuq il-prinċipju ta' l-ożmosi, i.e. it-tendenza naturali ta' molekuli solventi li jgħaddu minn membrana semi-permeabbli minn soluzzjoni dilwita għal soluzzjoni konċentrata biex jinkiseb l-ekwilibriju. Fit-test, is-soluzzjoni dilwita hija f'konċentrazzjoni żero, waqt li s-soluzzjoni konċentrata fiha l-polimer. L-effett tal-ġbid tas-solvent mill-membrana jikkawża differenzjal tal-pressjoni li huwa dipendenti fuq il-konċentrazzjoni u l-piż molekulari tal-polimer (1)(3)(4).

Applikabilità, $M_n < 20\,000 - 200\,000$.

1.4 Ożmometrija tal-Faži tal-Fwar.

tinvolvi l-paragun tar-rata ta' evaporazzjoni ta' *aerosol* tas-solvent pur ma' mill-anqas tliet *aerosols* li fihom il-polimer f'konċentrazzjonijiet varji (1)(5)(6) Applikabbiltà $M_n < 20\,000$.

Analiżi tal-Grupp Terminali $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analiżi tal-Grupp Terminali**

Biex jintuża dan il-metodu, huwa meħtieġ għarfien kemm ta' l-istruttura komplessiva tal-polimer kif ukoll in-natura tal-gruppi terminali tal-katina (li jridu jkunu distinti mill-iskeletru ewlieni b'eż.. NMR jew titrazzjoni/derivatizzazzjoni). Id-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni molekulari tal-gruppi terminali preżenti fuq il-polimer tista' twassal għal valur għall-piż molekulari (7) (8) (9).

Applikabbiltà, M_n sa 50 000 (b'affidabilità li tonqos).

3. **Referenzi**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **KONTENUT TA' POLIMERI TA' PIŻ MOLEKULARI BAXX**

1. **METODU**

Dan il-metodu ta' kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel hu ripetizzjoni ta' l-OECD TG 119 (1996). Il-prinċipji fundamentali u iktar informazzjoni teknika jinsabu bħala riferenzi.

1.1. DAĦLA

Ladarba l-proprjetajiet tal-polimeri huma daqshekk varji, huwa impossibbli li jiġi deskritt metodu wieħed li jagħti l-kondizzjonijiet preċiżi għas-separazzjoni u l-valutazzjoni li japplikaw għal kull sitwazzjoni u għal kull ħaġa li tiġri waqt is-separazzjoni tal-polimeri. Ta' spiss u b'mod partikolari, sistemi ta' polimeri kumplessi mhumiex soġġetti għall-kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel (GPC). Meta il-GPC mhuwiex prattikabbli, il-piż molekulari jista' jiġi deċiż b'metodi oħrajn (ara l-Anness). F'dawn il-każijiet, għandhom jingħataw id-dettalji u l-ġustifikazzjonijiet kollha għall-użu ta' dak il-metodu.

Il-metodu deskritt huwa bbażat fuq l-istandard DIN 55671 (1). F'dan l-istandard DIN tinsab informazzjoni dettaljata fuq kif għandhom jitmexxew dawn l-esperimenti u kif għandha tiġi vvalutata d-DATA. F'każ illi hemm bżonn li l-kondizzjonijiet ta' l-esperiment jinbidlu, dawn il-bidliet iridu jiġu ġġustifikati. Jistgħu jintużaw standards oħrajn jekk ikun hemm ir-referenzi kollha. Il-metodu deskritt juża kampjuni tal-polisterin ta' politixrid magħruf għall-kalibrazzjoni, u jista' jagħti l-każ li jrid jiġi modifikat biex jaqbel ma' ċerti polimeri, eż. polimeri li jinħallu fl-ilma u polimeri *long-chain branched*.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Piż molekulari baxx huwa deskritt arbitrarjament bħala piż molekulari ta' inqas minn 1 000 dalton.

Il-medja tal-piż molekulari tan-numru M_n u l-medja tal-piż molekulari tal-piż M_w huma ddeterminati skond l-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

fejn,

H_I = il-livell tas-sinjal tad-ditekter mil-linji bażi għall-volum ta' retenzjoni V_i,

M_i = M_i huwa t-toqol molekulari tal-frazzjoni tal-polimeri fil-volum ta' retenzjoni V_i, u n huwa n-numru tal-punti tad-DATA.

Il-wisa' tad-distribuzzjoni tat-toqol molekulari, li hija miżura tat-tixrid tas-sistema, huwa mogħti bil-proporzjon M_w/M_n.

▼B

1.3. SUSTANZI TA' RIFERENZA

Ladarba l-GPC huwa metodu relattiv, hemm bżonn ta' kalibrazzjoni. Normalment jintużaw standards tal-polistiren b'distribuzzjoni limitata u mibnija linearment u li għandhom piż molekulari medju M_n u M_w u distribuzzjoni ta' piż molekolari magħrufa. Il-kurva tal-kalibrazzjoni tista' tintuża biss fid-determinazzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun mhux magħruf jekk il-kondizzjonijiet għas-separazzjoni tal-kampjun u l-istandards intgħażlu b'mod preċiżament l-istess.

Ir-relazzjoni ddeterminata bejn il-piż molekulari u l-volum ta' elużjoni huwa validu biss taħt il-kondizzjonijiet speċifiċi ta' l-esperiment partikolari. Il-kondizzjonijiet fuq kollox jinkludu t-temperatura, s-solvent (jew taħlita tas-solventi), il-kondizzjonijiet tal-kromatografija u l-kolonna tas-separazzjoni jew is-sistemi tal-kolonni.

Il-piż molekulari tal-kampjuni ddeterminati b'dan il-mod huma valuri relattivi u huma deskritti bħala "piżijiet molekulari ekwivalenti għall-polistiren". Dan ifisser illi skond id-differenzi strutturali u kimiċi bejn il-kampjun u l-istandards, il-piżijiet molekulari jistgħu jiddevjaw mill-valuri assoluti sa grad iktar jew inqas. Jekk jintużaw standards oħrajn, eż. il-glikol tal-polietilin, l-ossidu tal-politin, il-metakrilat tal-polimetil, aċidu poliakriliku, għandha titniżżel ir-raġuni.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-EŻAMINAZZJONI

Kemm id-distribuzzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun kif ukoll il-piżijiet molekulari medji (M_n, M_w) jistgħu jiġu ddeterminati billi jintuża l-GPC. Il-GPC huwa metodu speċjali ta' kromatografija likwida fejn il-kampjun jiġi separat skond il-valuri idrodinamiċi tal-kostitwenti individwali (2).

Is-separazzjoni ssir kif il-kampjun jgħaddi minn ġo kolonna mimlija b'materjal poruż, tipikament ġel organiku. Molekoli żgħar jistgħu jippenetraw il-pori filwaqt li l-molekoli kbar ma jistgħux. Il-passaġġ tal-molekoli kbar huwa, għalhekk, iqsar u għalhekk huma jippenetraw l-ewwel. Il-molekoli ta'daqs medju jippenetraw minn uħud mill-pori u jgħaddu iktar tard. L-iżgħar molekoli, b'raġġ idrodinamiku medju iżgħar mill-pori tal-ġel jistgħu jippenetraw il-pori kollha. Dawn ikun elużi l-aħħar.

Idealment, is-separazzjoni hija ddeterminata biss skond id-daqs ta' l-ispeċi tal-molekoli, imma fil-prattika huwa diffiċli li wieħed jevita xi interferenza mill-assorbiment L-ippakkjar mhux ugwali tal-kolonni u volumi mejtin jistgħu jaggravaw is-sitwazzjoni (2).

L-osservazzjoni hija effetwata minn, eż. l-indiċi refrattiv jew l-assorbiment tal-UV u tagħti kurva tad-distribuzzjoni sempliċi. Madankollu, biex il-kurva tingħata valuri attwali tal-piż molekulari, huwa neċessarju li l-kolonna tiġi kkalibrata billi polimeri ta' piż molekulari magħruf u, idealment, ta' struttura simili ħafna, jitniżżlu 'l isfel, eż. standards tal-polistiren varji. B'mod tipiku, għandha tirriżulta kurva Gaussian, xi drabi mgħawwġa minħabba denb fuq in-naħa baxxa tal-piż molekulari, fejn il-fus vertikali jindika l-kwantità, skond il-piż, ta' l-ispeċi tal-piż molekulari varji, u l-fus orizzontali l-piż molekulari rreġistrat.

▼B

Il-kontenut tal-piż molekulari baxx huwa derivat minn din il-kurva. Il-kalkolu jista' jkun eżatt biss jekk l-ispeċi ta' piż molekulari baxx iġibu ruħhom bl-istess mod fuq bażi ta' piż għall-polimer sħiħ.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ir-ripetibilità (Devjazzjoni ta' Standard Relattiv: RSD) tal-volum ta' l-elużjoni għandha tkun aħjar minn 0,3 %. Ir-ripetibilità mixtieqa ta' l-analiżi għandha tiġi żgurata permezz ta' korrezzjoni skond standard intern jekk kromatogram huwa evalwat b'mod li huwa dipendenti fuq il-ħin u ma jaqbilx mal-kriterju msemmi hawn fuq (1). Il-politixrid jiddependi fuq il-piżijiet molekulari ta' l-istandards. Fil-każ ta' standards tal-polisterin, valuri tipiċi huma:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p huwa l-piż molekulari ta' l-istandard fil-quċċata tal-massimu)

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' L-EŻAMINAZZJONI

1.6.1. **Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet standard tal-polistirene**

L-istandards tal-polisterin huma maħlula permezz ta' taħlit bil-galbu fl-eluwent magħżul. Ir-rakkomandazzjonijiet tal-fabbrikant għandhom jiġu kkunsidrati waqt il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet.

Il-konċentrazzjonijiet ta' l-istandards li ntagħżlu huma dipendenti fuq fatturi varji, eż. il-volum ta' injezzjoni, il-viskożità tas-soluzzjoni u s-sensittività ta' l-indikatur analitiku. Il-volum massimu ta' injezzjoni għandu jiġi adattat għat-tul tal-kolonna, sabiex tiġi evitata t-tagħbija żejda. Il-volumi tipiċi ta' injezzjoni għal separazzjonijiet analitiċi bl-użu ta' GPC b'kolonna ta' 30 cm × 7,8 mm huma normalment bejn 40 u 100 µl. Volumi ogħla huma possibbli, imma m'għandhomx ikunu aktar minn 250 µl. L-aħjar proporzjon ta' volum ta' injezzjoni ma' konċentrazzjoni għandha tiġi ddeterminata qabel il-kalibrazzjoni attwali tal-kolonna.

1.6.2. **Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun**

Bħala prinċipju, l-istess ħtiġijiet japplikaw għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-kampjun. Il-kampjun hu maħlul f'solvent xieraq, e.g. tetraidrofuran (THF), billi jitħawwad bil-galbu. Taħt l-ebda ċirkustanzi m'għandu jiġi maħlul permezz ta' banju ultrasoniku. Meta meħtieġ, is-soluzzjoni tal-kampjun hija ppurifikata permezz ta' filtru tal-membrana b'daqs tal-pori ta' bejn 0,2 u 2 µm.

Il-preżenza ta' partikoli mhux maħlula għandha tiġi rreġistrata fir-rapport finali peress li dawn jistgħu jkunu minħabba speċi ta' piż molekulari għoli. Metodu xieraq għandu jintuża' biex jiġi ddeterminat il-persentaġġ f'piż tal-partikoli mhux maħlula. Is-soluzzjonijiet għandhom jintużaw fi żmien 24 siegħa.

▼B

1.6.3. **Korrezzjoni għal kontenut ta' impuritajiet u addittivi**

Korrezzjoni tal-kontenut ta' speċi ta' M < 1 000 għall-kontribuzzjoni minn komponenti speċifiċi mhux polimeri preżenti (eż. impuritajiet u/jew addittivi) hija ġeneralment meħtieġa, sakemm il-kontenut imkejjel mhux diġà <1 %. Dan jinkiseb permezz ta' analiżi diretta tas-soluzzjoni polimera jew l-elużjoni GPC.

F'każijiet fejn l-elużjoni, wara passaġġ mill-kolonna, hija wisq dilwita għal analiżi ulterjuri, din għandha tiġi kkonċentrata. Jista' jkun hemm il-ħtieġa li l-elużjoni tiġi evaporata san-nixfa u maħlula mill-ġdid. Konċentrazzjoni ta' l-elużjoni għandha tiġi miksuba taħt kondizzjonijiet li jassiguraw li l-ebda bidliet ma jseħħu fl-elużjoni. It-trattament ta' l-elużjoni wara l-pass tal-GPC hu dipendenti fuq il-metodu analitiku użat għad-determinazzjoni kwantitattiva.

1.6.4. **Apparat**

L-apparat GPC jinkludi l-komponenti li ġejjin:

— reservoir tas-solventi,

— *degasser* (fejn hemm bżonn),

— pompa,

— apparat li jnaqqas l-impuls (fejn hemm bżonn),

— sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tal-kromatografija,

— indikatur,

— *flowmeter* (fejn hemm bżonn)

— reġistratur-proċessur tad-data,

— reċipjent għall-iskart.

Għandu jiġi żgurat li s-sistema GPC hija inerta fir-rigward tas-solventi użati (eż. bl-użu ta' kapillari ta' l-azzar għas-solvent THF).

1.6.5. **L-injezzjoni u s-sistema li twassal s-solventi**

Volum definit tal-kampjun tas-soluzzjoni jitgħabba fuq il-kolonna bl-użu ta' *auto-sampler* jew manwalment f'żona definita preċiżament. L-irtirar jew l-għafis tal-*plunger* tas-siringa b'mod mgħaġġel, jekk isir manwalment, jista' jikkawża bidliet fid-distribuzzjoni tal-piż molekulari osservata. Is-sistema tat-twassil tas-solvent għandha, safejn huwa possibbli, tkun ħielsa mill-impulsi u idealment għandha tinkludi apparat li jnaqqas l-impulsi. Il-*flowrate* tkun madwar 1 ml/min.

1.6.6. **Il-kolonna**

Skond il-kampjun, il-polimer ikun karatterizzat mill-użu ta' kolonna sempliċi jew minn numru ta' kolonni konnessi f'sekwenza. Għadd ta' materjali poruži tal-kolonni bi proprjetajiet definiti (eż. daqs tal-pori, limiti ta' esklużjoni) huma disponibbli kummerċjalment. L-għażla tal-ġel ta' separazzjoni jew tat-tul tal-kolonna jiddependi fuq il-proprjetajiet tal-kampjun (volumi idrodinamiċi, distribuzzjoni tal-piż molekulari) u l-kondizzjonijiet speċifiċi għas-separazzjoni bħas-solventi, t-temperatura u l-*flowrate* (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Il-pjanċi teoretiċi**

Il-kolonna jew il-kombinazzjoni tal-kolonni użati għas-separazzjoni għandhom jiġu karatterizzati skond in-numru ta' pjanċi teoretiċi. Dan jinvolvi, f'każ meta t-THF huwa s- solvent eluwent, it-tagħbija ta' soluzzjoni ta' etile benżin jew ta' sustanza maħlula mhux b'polarità xierqa fuq kolonna ta' tul magħruf. In-numru ta' pjanċi teoretiċi huwa mogħti skond l-ekwazzjoni li ġejja:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{or} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

fejn,

N = in-numru tal-pjanċi teoretiċi

V_e = il-volum ta' elużjoni fil-quċċata tal-massimu

W = il-quċċata tal-wisa' tal-linja bażi

$W_{1/2}$ = il-quċċata tal-wisa' fin-nofs ta' l-għoli

1.6.8. **L-effiċjenza tas-separazzjoni**

Flimkien ma' l-ammont tal-pjanċi teoretiċi, li hija kwantità li tistabbilixxi il-*bandwidth*, l-effiċjenza tas-separazzjoni għandha sehem ukoll, u din hija stabbilita skond kemm hi wieqfa l-kurva tal-kalibrazzjoni. L-effiċjenza tas-separazzjoni ta' kolonna tinkisebskond ir-relazzjoni li ġejja:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

fejn,

$V_{e,\ M_x}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari ta' għaxar darbiet iktar

Ir-riżoluzzjoni tas-sistema hija normalment definita kif ġej:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

fejn,

V_{e1}, V_{e2} = il-volumi ta' elużjoni taż-żewġ standards tal-polistiren fil-quċċata tal-massimu

W_1, W_2 = il-quċċata tal-wisat tal-linji ta' bażi

M_1, M_2 = il-piżijiet molekulari fil-quċċata tal-massimu (għandu jkun hemm differenza b' fattur ta' 10)

Il-valur R għas-sistema tal-kolonni għandu jkun ikbar minn 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solventi**

Is-solventi kollha għandhom ikollhom purità għolja (għat-THF tintuża purità ta' 99,5 %). Id-depożitu tas-solventi (f'atmosfera ta' gass inert, jekk huwa neċessarju) għandu jkun kbir biżżejjed għall-kalibrazzjoni tal-kolonna u għal diversi analiżijiet tal-kampjuni. Il-gass għandu jitneħħa mis-solvent qabel ma jgħaddi għall-kolonna minn ġo pompa.

1.6.10. **Kontroll tat-temperatura**

It-temperatura tal-komponenti kruċjali interni (iċ-ċirku ta' injezzjoni (*injection loop*), il-kolonni, id-ditekter, u t-tubi) għandha tkun kostanti u konsistenti skond l-għażla tas-solvent.

1.6.11. **Ditekter**

Il-funzjoni tad-ditekter hija li jirreġistra b'mod kwantitattiv il-konċentrazzjoni tal-kampjun li ġie elwat mill-kolonna. Biex jiġi evitat li l-quċċati jitwessgħu, il-volum tal-*cuvette* taċ-ċellula tad-ditekter għandu jinżamm żgħir kemm jista' jkun. M'għandux ikun akbar minn 10 µl ħlief għal ditekters li jxerrdu d-dawl u għal ditekters tal-viskożità. Normalment tintuża rifrattometrija differenzjali għall-osservazzjoni. Madankollu, jekk meħtieġ mill-proprjetajiet speċifiċi tal-kampjun jew tas-solvent ta' elużjoni, jistgħu jintużaw ditekters oħrajn, eż. UV/VIS, IR, ditekters tal-viskożità, eċċ.

2. **DATA U RAPPURTAR**

2.1. DATA

L-istandard DIN (1) għandu jiġi kkonsultat għall-kriterji ta' valutazzjoni dettaljata kif ukoll għall-kondizzjonijiet għall-ġbir u għall-proċessar ta' DATA.

Għal kull kampjun għandhom isiru żewġ esperimenti indipendenti. Għandhom jiġu analizzati individwalment. Fil-każijietjiet kollha hu essenjzali li tiġi ddeterminata wkoll DATA minn *blanks*, ittrattati taħt l-istess kondizzjonijiet tal-kampjun.

Huwa meħtieġ li jiġi indikat b'mod espliċitu li l-valuri mkejla huma valuri relattivi ekwivalenti għall-piż molekulari ta' l-istandard użat.

Wara determinazzjoni tal-volumi taż-żamma jew tal-ħinijiet taż-żamma (possibilment ikkoreġuti bl-użu ta' standard intern), valuri log M_p (M_p meqjus bħala l-ogħla quċċata ta' l-istandard tal-kalibrazzjoni) jitniżżlu ħdejn waħda minn dawn il-kwantitajiet. Mill-inqas żewġ punti ta' kalibrazzjoni huma meħtieġa għal kull sett ta' għaxaa piżijiet molekulari, u mill-inqas ħames punti ta' kejl huma meħtieġa għall-kurva totali, li għandha tkopri l-piż molekulari stmat għall-kampjun. Il-punt ta' tmiem baxx tal-piż molekulari tal-kurva ta' kalibrazzjoni huwa mfisser minn *n-hexyl* benżin jew minn soluzzjonimaħlula mhux polari oħra xierqa. Il-porzjon tal-kurva li jikkorrispondi għall-piż molekulari taħt 1 000 huwa ddeterminat u kkoreġut kif meħtieġ għall-impuritajiet u l-addittivi. Il-kurvi ta' l-elużjoni huma ġeneralment stmati permezz ta' l-ipproċessar elettroniku tad-DATA. Fil-każ li tintuża diġitazzjoni manwali, ASTM D 3536-91 jista' jiġi kkonsultat (3).

▼B

Jekk kwalunkwe polimer li ma jinħallx jinżamm fil-kolonna, il-piż molekulari tiegħu x'aktarx li jkun ogħla minn dak tal-frazzjoni li tinħall, u jekk ma jiġix ikkunsidrat jista' jirriżulta fi stima eċċessiva tal-kontenut tal-piż molekulari baxx. Gwida għall-korrezzjoni tal-kontenut tal-piż molekulari baxx għall-polimer li ma jinħallx hija prevista fl-Anness.

Il-kurva tad-distribuzzjoni għandha tiġi pprovduta f'forma ta' tabella jew figura (frekwenza differenzjali jew persentaġġi tas-somom ma' log M). Fir-rappreżentazzjoni grafika, sett wieħed ta' għaxar piżijiet molekulari huwa normalment wiesa' 4 cm u l-massimu tal-quċċata għandu jkun twil xi 8 cm. F'każ ta' kurvi tad-distribuzzjoni integrali, d-differenza fil-koordinat bejn 0 u 100 % għandha tkun ta' xi 10 cm.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Sustanza tat-test**

— informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test (identità, addittivi, impuritajiet),

— deskrizzjoni tat-trattament tal-kampjun, osservazzjonijiet, problemi.

2.2.2. **Strumentazzjoni**

— kontenitur ta' l-eluwent, gass inert, tneħħija ta' gass żejjed ta' l-eluwent, kompożizzjoni ta' l-eluwent, impuritajiet,

— pompa, apparat li jnaqqas il-polz, sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tas-separazzjoni (il-fabbrikant, l-informazzjoni kollha dwar il-karatteristiċi tal-kolonni bħad-daqs tal-pori, it-tip ta' materjal ta' separazzjoni eċċ., in-numru, it-tul u l-ordni tal-kolonni użati),

— numru ta' pjanċi teoretiċi tal-kolonni (jew kombinazzjoni), effiċ-jenza tas-separazzjoni (riżoluzzjoni tas-sistema).

— informazzjoni dwar is-simetrija tal-quċċati,

— temperatura tal-kolonni, tip ta' kontroll tat-temperatura,

— indikatur (prinċipju tal-kejl, tip, *cuvette*, volum),

— *flowmeter* jekk użat (il-fabbrikant, il-prinċipju tal-kejl),

— sistema għar-reġistrazzjoni u proċessar tad-DATA (*hardware* u *software*)

2.2.3. **Kalibrazzjoni tas-sistema**

— deskrizzjoni dettaljata tal-metodu użat biex tinbena l-kurva tal-kalibrazzjoni,

▼B

— informazzjoni dwar il-kriterji ta' kwalità ta' dan il-metodu (eż. koeffiċjent tal-korrelazzjoni, *error sum of squares* eċċ.),

— informazzjoni dwar l-estrapolazzjonijiet, l-assunzjonijiet u l-approssimazzjonijiet li saru waqt il-proċedura esperimentali u l-valutazzjoni u l-proċessar tad-DATA,

— il-kejl kollu użat għall-kostruzzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni għandu jiġi dokumentat f'tabella li tinkludi l-informazzjoni li ġejja għal kull punt ta' kalibrazzjoni:

  — l-isem tal-kampjun,

  — il-fabbrikant tal-kampjun,

  — il-valuri karatteristiċi ta' l-istandards M_p, M_n, M_w u M_w/M_n, kif ipprovduti mill-fabbrikant jew kif miġjuba minn kejl sussegwenti, flimkien ma' dettalji dwar il-metodu ta' determinazzjoni,

  — il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni,

  — il-valur M_p użat għall-kalibrazzjoni,

  — il-valur ta' l-elużjoni jew il-ħin taż-żamma kkoreġut imkejjel fl-ogħla punt massimu,

  — l-M_p kkalkulat fl-ogħla punt massimu,

  — il-persentaġġ ta' żball ta' l-M_p kkalkulat u l-valur tal-kalibrazzjoni.

2.2.4. **Informazzjoni dwar il-kontenut polimeru ta' piż molekulari baxx**

— deskrizzjoni tal-metodi użati fl-analiżi u l-mod li bih twettqu l-esperimenti;

— informazzjoni dwar il-persentaġġ ta' kontenut ta' speċi ta' piż molekulari baxx (w/w) relatat mal-kampjun totali,

— informazzjoni dwar impuritajiet, addittivi u speċi oħra mhux polimeri f'persentaġġ f'piż relatat mal-kampjun totali.

2.2.5. **Valutazzjoni:**

— valutazzjoni fuq bażi ta' ħin: il-metodi użati biex tkun żgurata r-riproduzzjoni meħtieġa (metodu ta' korrezzjoni, standard intern, eċċ.),

— informazzjoni dwar jekk l-istima ġietx affettwata fuq il-bażi tal-volum ta' l-elużjoni jew il-ħin taż-żamma,

— informazzjoni dwar il-limiti tal-valutazzjoni jekk quċċata mhijiex analizzata kompletament,

— deskrizzjoni ta' metodi li jneħħu x-xkiel, jekk użati,

— proċeduri ta' preparazzjoni u trattament minn qabel tal-kampjun,

— il-preżenza ta' partikoli mhux maħlulin, jekk hemm,

▼B

— il-volum ta' l-injezzjoni (µl) u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni (mg/ml),

— osservazzjonijiet li jindikaw effetti li jwasslu għal devjazzjonijiet mill-profil GPC ideali,

— deskrizzjoni dettaljata tal-modifikazzjonijiet kollha fil-proċeduri ta' l-ittestjar,

— dettalji ta' l-iskali ta' żbalji,

— kwalunkwe informazzjoni oħra u osservazzjonijiet rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati,

3. **REFERENZI**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Appendiċi

Gwida għall-korrezzjoni tal-kontenut molekulari baxx għall-preżenza ta' polimeri insolubbli

Meta hemm polimer insolubbli f'kampjun, dan jirriżulta f'telf tal-piż matul l-analiżi GPC. Il-polimer insolubbli jinżamm b'mod irriversibbli fuq il-kolonna jew il-filtru tal-kampjun waqt li l-porzjon solubbli tgħaddi mill-kolonna. Fil-każ fejn iż-żieda fl-indiċi rifrattiva (dn/dc) tal-polimer tista' tkun stmata jew imkejla, wieħed jista' jistma' l-piż tal-kampjun mitluf fuq il-kolonna. F'dak il-każ, wieħed jagħmel korrezzjoni bl-użu ta' kalibrazzjoni esterna b'materjali standard ta' konċentrazzjoni magħrufa u dn/dc magħruf sabiex ikun ikkalibrat ir-reazzjoni tar-rifrattometru. Fl-eżempju hawn taħt jintuża standard *poly* (*methyl methacrylate)* (pMMA).

Fil-kalibrazzjoni esterna għall-analiżi ta' polimeri akriliċi, standard pMMA ta' konċentrazzjoni magħrufa fit-tetraidrofuran, jiġi analizzat bil-GPC u d-data li tirriżulta tintuża biex jinsab il-kostanti tar-rifrattometru skond l-ekwazzjoni:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

fejn:

K = il-kostanti tar-rifrattometru (f'microvolt second/ml),

R = it-tweġiba ta' l-istandard pMMA (f'microvolt/second),

C = il-konċentrazzjoni ta' l-istandard pMMA (f'mg/ml),

V = il-volum ta' l-injezzjoni (f'ml) u

dn/dc = iż-żieda fl-indiċi rifrattiv għall-pMMA f'tetraidrofuran (f'ml/mg).

The following data are typical for a pMMA standard:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Il-valur K li jirriżulta, $3{,}05 \times 10^{11}$ imbagħad jintuża biex tkun ikkalkulata r-reazzjoni teoretika tad-ditekter jekk 100 % tal-polimer injettat kien elwat permezz tad-ditekter.

▼B

A.20. **L-IMĠIBA TAS-SOLUZZJONI/TA' L-ESTRAZZJONI TA' POLIMERI FL-ILMA**

1. **METODU**

Il-metodu deskritt huwa repetizzjoni tal-verżjoni reveduta ta' l-OECD TG 120 (1997). Aktar informazzjoni teknika tingħata bħala referenza (1).

1.1. DAĦLA

Għal ċerti polimeri, bħall-polimeri ta' emulsjoni, xogħol ta' preparazzjoni inizjali jista' jkun meħtieġ qabel ma jista' jintuża' l-metodu stabbilit minn hawn 'il quddiem. Il-metodu mhuwiex applikabbli għal polimeri likwidi u għal polimeri li jirreaġixxu ma' l-ilma taħt il-kondizzjonijiet ta' l-ittestjar.

Meta l-metodu mhuwiex prattiku jew mhuwiex possibbli, l-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tista' tiġi investigata permezz ta' metodi oħrajn. F'każijiet bħal dawn, dettalji sħaħ u ġustifikazzjoni sħiħa għandhom jingħataw għall-metodu użat.

1.2. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

L-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni ta' polimeri f'sustanza ta' l-ilma hija ddeterminata bl-użu tal-metodu tal-flixkun (ara A.6 is-solubilità fl-ilma, metodu tal-flixkun) bil-modifikazzjonijiet deskritti hawn taħt.

1.4. KRITERJI TA' KWALITÀ

Xejn.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

1.5.1. **Apparat**

L-apparat li ġej hu meħtieġ għall-metodu:

— mezz ta' tifrik, eż. mola għall-produzzjoni ta' partikoli ta' daqs magħruf,

— apparat għat-tħawwid bil-possibiltà ta' kontroll tat-temperatura,

— sistema ta' l-iffiltrar tal-membrana,

— apparat analitiku xieraq,

— għarbiela standardizzati.

1.5.2. **Preparazzjoni tal-kampjun**

Kampjun rappreżentattiv għandu l-ewwel jitnaqqas sa daqs ta' partikolu bejn 0,125 u 0,25 mm bl-użu ta' għarbiela xierqa. Jista' jkun meħtieġ tkessiħ għall-istabbilità tal-kampjun jew għall-proċess tad-tħin. Materjali ta' natura li tixbah il-lastiku jistgħu jitfarrku fit-temperatura tan-nitroġenu likwidu (1).

Jekk il-frazzjon tad-daqs tal-partikolu meħtieġ ma jistax jinkiseb, għandha tittieħed azzjoni biex kemm jista' jkun jitnaqqas id-daqs tal-partikoli u r-riżultat jiġi rrappurtat. Fir-rapport, huwa meħtieġ li jiġi indikat il-mod li bih il-kampjun imfarrak kien maħżun qabel it-test.

▼B

1.5.3. **Proċedura**

Tliet kampjuni ta' 10g tas-sustanza tat-test jintiżnu f'kull wieħed minn tliet kontenituri li għandhom *stopper* tal-ħġieġ u jiżdiedu 1 000 ml ta' ilma f'kull kontenitur. Jekk it-trattament ta' ammont ta' polimeru ta' 10 g jidher li mhuwiex prattikabbli, l-ogħla ammont li jmiss li jista' jiġi ttrattat għandu jintuża' u l-volum ta' ilma jiġi aġġustat skond dan.

Stoppers jitqiegħdu fuq il-kontenituri u jiġu ssikkati u mbgħad jitħawdu f'temperatura ta' 20 °C. Għandu jintuża apparat ta' ċaqliq jew tħawwid li kapaċi jaħdem f'temperatura kostanti. Wara perjodu ta' 24 siegħa, il-kontenut ta' kull kontenitur huwa ċċentrifugat u ffiltrat u l-konċentrazzjoni ta' polimer fil-fażi ċara ta' l-ilma hija ddeterminata permezz ta' metodu analitiku xieraq. Jekk metodi analitiċi xierqa għall-fażi ta' l-ilma mhumiex disponibbli, is-solubilità/l-estrattività totali tista' tiġi stmata mill-piż niexef tar-residwu tal-filtru jew tal-preċipitat iċċentrifugat.

Is-soltu ikun hemm il-ħtieġa li jkun hemm differenza kwantitattiva bejn l-impuritajiet u l-additttivi min-naħa l-waħda u l-ispeċi ta' piż molekulari baxx min-naħa l-oħra. Fil-każ ta' determinazzjoni gravimetrika, huwa importanti wkoll li titwettaq prova blank mingħajr sustanza għat-test sabiex jinkiseb għarfien dwar residwi li ġejjin mill-proċedura esperimentali.

L-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni ta' polimeri fl-ilma f'temperatura ta' 37 °C f'pH 2 u pH 9 tista' tiġi ddeterminata bl-istess mod kif deskritt fit-twettiq ta' l-esperiment f'temperatura ta' 20 °C. Il-valuri tal-pH jistgħu jinkisbu biż-żieda jew sustanzi ta' protezzjoni xierqa jew ta' aċidi jew ta' bażi xierqa bħal aċidu idrokloriku, aċidu aċetiku, sodju ta' grad analitiku jew idrossidu tal-potassju jew NH_3.

Skond il-metodu ta' analiżi użat, għandhom jitwettqu test wieħed jew żewġ testijiet. Meta metodi speċifiċi biżżejjed ikunu disponibbli għall-analiżi diretta tal-fażi ta' l-ilma għall-komponent tal-polimer, test wieħed kif deskritt hawn fuq għandu jkun biżżejjed. Madankollu, meta dawn il-metodi mhumiex disponibbli u d-determinazzjoni ta' l-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tal-polimer hija limitata għall-analiżi indiretta billi jiġi iddeterminat biss il-kontenut totali ta' karbonju organiku (TOC) ta' l-estratt ta' l-ilma, test addizzjonali għandu jitwettaq. Dan it-test addizzjonali għandu wkoll jsir tliet darbiet, bl-użu ta' kampjuni ta' polimeri li huma 10 darbiet iżgħar u bl-istess ammonti ta' ilma użati fl-ewwel test.

1.5.4. **Analiżi**

1.5.4.1. *Test imwettaq b'daqs wieħed ta' kampjun*

Jista' jkun hemm metodi disposnibbli għall-analiżi diretta ta' komponenti polimeri fil-fażi ta' l-ilma. Inkella, analiżi indiretta ta' komponenti polimeri maħlula/estratti, permezz tad-determinazzjoni tal-kontenut totali ta' partijiet li jinħallu u l-korrezzjoni għal komponenti polimeri mhux speċifiċi, tista' wkoll tiġi kkunsidrata.

Analiżi tal-fażi ta' l-ilma għall-ispeċi polimerika totali hija possibbli:

jew permezz ta' metodu sensittiv biżżejjed, eż.

— TOC li tuża diġestjoni ta' persulfat jew dikromata biex tagħti CO_2 segwita bi stima permezz ta' IR jew ta' analiżi kimika,

▼B

— spettrometrija atomika ta' l-assorbiment (AAS) jew l-emissjoni tal-plasma tagħha magħquda b'mod induttiv (ICP) ekwivalenti għal silikone jew polimer li jkun fih il-metall,

— assorbiment ta' l-UV jew spettrofluworimetrija għall-polimeri *aryl*,

— LC-MS għal kampjuni ta' piż molekulari baxx.

jew permezz ta' evaporazzjoni b'vakwu san-nixfa ta' l-estratt ta' l-ilma u analiżi spettroskopika (IR, UV, eċċ.) jew AAS/ICP tar-residwu.

Jekk analiżi tal-faża ta' l-ilma fiha nnifisha mhijiex prattikabbli, l-estratt ta' l-ilma għandu jiġi estratt b'solvent organiku li ma jistax jitħallat ma' l-ilma, eż. idrokarbonju klorinat. Is-solvent huwa mbagħad evaporat u r-residwu huwa analizzat kif imsemmi hawn fuq għall-kontenut polimeru notifikat. Kwalunkwe komponenti f'dan ir-residwu li huma identifikati bħala impuritajiet jew addittivi għandhom jitnaqqsu għall-iskop tad-determinazzjoni tal-grad ta' soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tal-polimer nnifsu.

Meta kwantitajiet relattivament kbar ta' dawn il-materjali huma preżenti, jista' jkun meħtieġ li r-residwu jiġi soġġett għal, eż. analiżi HPLC jew GC biex jiġu differenzjati l-impuritajiet preżenti li ġejjin mill-ispeċi monomeri jew li ġejjin mill-monomeri sabiex il-kontenut veru ta' dawn ta' l-aħħar jista' jiġi ddeterminat.

F'xi każijiet, jista' jkun suffiċjenti li ssir evaporazzjoni sempliċi tas-solvent organiku san-nixfa u li jintiżen ir-residwu niexef.

1.5.4.2. *Test imwettaq b'żewġ daqsijiet differenti ta' kampjun*

L-estratti ta' l-ilma kollha huma analizzati għat-TOC.

Determinazzjoni gravimetrika titwettaq fuq il-parti mhux maħlula/mhux estratta tal-kampjun. Jekk, wara ċ-ċentrifugazzjoni jew l-iffiltrar tal-kontenut ta' kull kontenitur, residwi polimeri jibqgħu mwahħlin mal-ħajt tal-kontenitur, il-kontenitur għandu jitlaħlaħ bil-filtrat sa kemm il-kontenitur jitnaddaf mir-residwi viżibbli kollha. Wara dan, il-filtrat huwa ċċentrifugat jew iffiltrat għal darb'oħra. Ir-residwi li jibqgħu fuq il-filtru jew fit-tubu taċ-ċentrifugu jitnixxfu f'temperatura ta' 40 °C taħt vakwu u jintiżnu. It-tnixxif jitkompla sakemm jintlaħaq piż kostanti.

2. **DATA**

2.1. TEST IMWETTAQ B'DAQS WIEĦED TAL-KAMPJUN

Ir-riżultati individwali għal kull wieħed mit-tliet fliexken u l-valuri medji għandhom jingħataw u għandhom ikunu espressi f'unitajiet ta' piż għal kull volum tas-soluzzjoni (tipikament mg/l) jew piż għal kull piż ta' kampjun tal-polimeru (tipikament mg/g). Barra dan, it-telf ta' piż tal-kampjun (ikkalkulat bħala l-piż tas-sustanza maħlula mnaqqsa mill-piż tal-kampjun inizjali) għandu wkoll jingħata. Id-devjazzjonijiet relattivi standard (RSD) għandhom jiġu kkalkulati. Figuri individwali għandhom jingħataw għas-sustanza totali (polimer + addittivi essenzjali, eċċ.) u għall-polimer biss (jiġifieri wara t-tnaqqis tal-kontribuzzjoni minn dawn l-addittivi).

▼B

2.2. TEST IMWETTAQ B'ŻEWĠ DAQSIJIET DIFFERENTI TAL-KAMPJUN

Il-valuri TOC individwali ta' l-estratt ta' l-ilma taż-żewġ esperimenti ripetuti għal tliet darbiet u l-valur medju għal kull esperiment għandu jingħata espress bħala unità ta' piż għal kull volum ta' soluzzjoni (tipikament mgC/1), kif ukoll f'unità ta' piż għal kull piż tal-kampjun inizjali (tipikament mgC/g).

Jekk m'hemm l-ebda differenza bejn ir-riżultati fil-proporzjonijiet għolja u baxxi tal-kampjun/ilma, dan jista' jindika li l-komponenti li setgħu jiġu estratti kienu fil-fatt estratti kollha. F'dan il-każ, analiżi diretta m'għandhiex normalment tkun meħtieġa.

Il-piżijiet individwali tar-residwi għandhom jingħataw u jiġu espressi f'persentaġġ tal-piżijiet inizjali tal-kampjuni. Il-medji għandhom jiġu kkalkulati għal kull esperiment. Id-differenzi bejn 100 u l-persentaġġi li nstabu jirrappreżentaw il-persentaġġi ta' materjal li jinħall u li jista' jiġi estratt fil-kampjun oriġinali.

3. **RAPPURTAR**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

3.1.1. **Is-sustanza għat-test**

— informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza għat-test (identità, addittivi, impuritajiet, kontenut ta' speċi ta' piż molekulari baxx).

3.1.2. **Kondizzjonijiet esperimentali**

— deskrizzjoni tal-proċeduri użati u kondizzjonijiet esperimentali,

— deskrizzjoni tal-metodi analitiċi u ta' osservazzjoni.

3.1.3. **Riżultati**

— riżultati tal-kapaċità li jinħall/jiġi estratt f'mg/l; valuri medji u individwali għat-testijiet ta' l-estrazzjoni fis-soluzzjonijiet varji, imqassmin f'kontenut polimeru u impuritajiet, addittivi, eċċ.,

— riżultati tal-kapaċità li jinħall/jiġi estratt f'mg/g ta' polimer,

— valuri TOC ta' estratti ta' l-ilma, piż tas-sustanza li tinħall u l-persentaġġi kkalkulati, jekk imkejlin,

— il-pH ta' kull kampjun,

— informazzjoni dwar il-valuri vojta,

— fejn meħtieġ, referenzi għall-instabilità kimika tas-sustanza tat-test, kemm matul il-proċess ta' l-ittestjar kif ukoll il-proċess analitiku,

— l-informazzjoni kollha li hija importanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **PROPRJETAJIET OSSIDIZZANTI (LIKWIDI)**

1. **METODU**

1.1 INTRODUZZJONI

Dan il-metodu tat-test huwa ddisinjat sabiex ikejjel il-potenzjal ta' sustanza likwida li żżid ir-rata tal-ħruq jew l-intensità tal-ħruq ta' sustanza kombustibbli, jew li tifforma taħlita ma' sustanza kombustibbli li tieħu n-nar b'mod spontanju, meta it-tnejn ikunu kompletament imħallta. Dan huwa bbażat fuq it-test tan-NU dwar likwidi ossidizzanti (1) u huwa ekwivalenti għalih. B'danakollu, minħabba li dan il-metodu A.21 huwa primarjament iddisinjat biex jissodisfa l-ħtiġijiet tar-Regolament 1907/2006, huwa meħtieg il-paragun ma' sustanza ta' referenza waħda. It-testijiet u l-paragun ma' sustanzi addizzjonali ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa meta jkun mistenni li r-riżultati tat-test se jintużaw għal skopijiet oħrajn. ([1])

Dan it-test mhux bil-fors li jitwettaq meta l-eżami tal-formula struttrali jistabbilixxi lil hinn minn kull dubbju raġjonevoli li s-sustanza ma jistax ikollha reazzjoni eżotermika ma' materjal kombustibbli.

Huwa utli li jkun hemm informazzjoni preliminarja dwar il-potenzjal tal-proprjetajiet esplożivi tas-sustanza qabel ma jitwettaq it-test.

Dan it-test mhux applikabbli għal solidi, gassijiet, sustanzi li huma ferm fjammabbli jew splussivi, jew perossidi organiċi.

Dan it-test jista' ma jsirx meta r-riżultati tas-sustanza għat-test fit-test tan-NU għal likwidi ossidanti (1) ikunu diġà disponibbli.

1.2 DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Iż-żieda fil-ħin tal-pressjoni medja hija l-medja tal-ħinijiet imkejla għal taħlita li tkun għat-test sabiex tipproduċi żieda fil-pressjoni minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar minn dik atmosferika.

1.3 SUSTANZA TA' REFERENZA

65 % (w/w) aċidu nitriku fl-ilma (grad analitiku) huwa meħtieġ bħala sustanza ta' referenza ([2]).

([1]) Kif, per eżempju, muri fil-kwadru tar-regolamenti ta' trasport tan-NU.

([2]) L-aċidu għandu jiġi ttitrat qabel it-test sabiex tiġi kkonfermata l-konċentrazzjoni tiegħu.

▼B

L-aħjar, jekk l-esperiment jipprevedi li r-riżultati ta' dan it-test jistgħu eventwalment ikunu użati għal skopijiet oħrajn ([1]), l-ittestjar ta' sustanzi ta' referenza addizzjonali jista' jkun xieraq ukoll ([2]).

1.4 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-likwidu għat-test jitħawwad fi proporzjon ta' 1: 1, bil-piż, ma' ċellulożi fibruża u jiġi introdott f'reċipjent ta' pressjoni. Jekk waqt it-taħlit jew waqt il-mili jaqbad b'mod spontanju, l-ebda test ieħor ma jkun meħtieġ.

Jekk ma jaqbadx b'mod spontanju it-test kollu għandu jitwettaq. It-taħlita tisaħħan f'reċipjent ta' pressjoni u l-ħin medju jkun irreġistrat għall-pressjoni li titla' minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar mill-pressjoni atmosferika. Dan jitqabbel maż-żieda fil ħin tal-pressjoni medja għat-taħlita 1: 1 tas-sustanza(i) ta' referenza u ċ-ċellulożi.

1.5 KRITERJA TA' KWALITÁ

F'serje ta' ħames provi fuq sustanza waħda l-ebda riżultat m'għandu jiddiferixxi b'aktar minn 30 % mill-medja aritmetika. Ir-riżultati li jiddiferixxu b'aktar minn 30 % minn dik il-medja għandhom jitwarrbu, il-proċedura tat-taħlit jew tal-mili tittejjeb u t-test jiġi ripetut.

1.6 DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1 **Preparazzjoni**

1.6.1.1 *Sustanza kombustibbli*

Sustanza xotta, fibruża, biċ-ċellulożi b'fibra b'tul ta' bejn 50 u 250 μm u dijametru medju ta' 25 μm, ([3]) tintuża bħala l-materjal kombustibbli. Din titnixxef għal piż kostanti f'saff ta' mhux aktar minn 25 mm ħxuna f'105 °C għal 4 sigħat u tinżamm f'dessikatur, bid-dessikant, sakemm tibred u tkun meħtieġa għall-użu. Il-kontenut ta' l-ilma taċ-ċellulożi xotta għandu jkun anqas minn 0,5 % f'piż xott ([4]). Jekk meħtieġ, il-ħin tat-tnixxif għandu jittawwal sabiex jintlaħaq dan il-livell ([5]). L-istess lott ta' ċellulożi għandu jintuża matul it-test kollu.

([1]) Kif, per eżempju, muri fil-kwadru tar-regolamenti ta' trasport tan-NU.
([2]) Eż.: 50 % (w/w) aċidu perkloriku u 40 % (w/w) klorat tas-sodju jintużaw f'referenza 1.
([3]) eż. Trab taċ-Ċelluloża għal — Kolonni tal-Kromatografija Whatman CF11, nru tal-katalgu 4021050.
([4]) Konfermat minn (eż.) titrazzjoni Karl-Fisher.
([5]) Alternattivament, dan il-kontenut ta' ilma jista' jintlaħaq (eż.) b'tisħin f'105 °C taħt vakwu għal 24 h.

▼B

1.6.1.2 *Apparat*

1.6.1.2.1 Reċipjent ta' pressjoni

Reċipjent ta‘ pressjoni huwa meħtieġ. Ir-reċipjent jikkonsisti minn reċipjent ċilindriku ta' pressjoni ta' l-azzar 89 mm tul u 60 mm dijametru estern (ara l-figura 1). Żewġ pjanċi huma msawwra b'magna fuq in-naħat opposti (il-*cross section* tar-reċipjent b'hekk tonqos għal 50 mm) sabiex ikun iffaċilitat it-twaħħil tal-plagg li jqabbad u tat-tapp tal-vent. Ir-reċipjent, b'ċirkonfernza interna ta' 20 mm u ribattut f'kull tarf għall-fond ta' 19 mm u b'kamin li jaċċetta 1” *British Standard Pipe* (BSP) jew l-ekwivalenti metriku. It-*take-off* tal-pressjoni, fl-għamla ta' driegħ laterali, tiġi invitata fuq il-wiċċ tal-kurva tar-reċipjent ta' pressjoni, 35 mm minn tarf wieħed u 90° mill-pjanċi msawwra b'magna. Il-plagg għal dan jitħaffer għal fond ta' 12 mm u jingħata l-kamin sabiex jaċċetta 1/2” BSP (jew metriku ekwivalenti) fit-tarf l-ieħor tad-driegħ. Jekk meħtieġ, siġill inert jitwaħħal sabiex jassigura siġill li ma jgħaddix gass minnu. Id-driegħ tal-ġenb jestendi għall-55 mm lil hinn mil-qafas tar-reċipjent ta' pressjoni u jkollu ħofra interna ta' 6 mm. It-tarf tad-driegħ tal-ġenb ikun ribattut u jkollu kamin sabiex jaċċetta *transducer* tal-pressjoni tat-tip bid-dijaframma. Kwalunkwe apparat li jkejjel il-pressjoni jista' jintuża basta dan ma jkunx effettwat minn gassijiet sħan jew minn dikompożizzjoni ta' prodotti u jkun kapaċi jirrispondi għal rati ta' żieda fil-pressjoni ta' 690-2 070 kPa f'mhux aktar minn 5ms.

It-tarf l-aktar 'il bogħod mid-driegħ tal-ġenb tar-reċipjent ta‘ pressjoni jingħalaq bi plagg li jqabbad u li jkun mgħammar b'żewg elettrodi, waħda insulata minn ġewwa, u l-oħra mwaħħla ma' l-*earth*, mal-plagg taċ-ċilindru. It-tarf l-ieħor tar-reċipjent ta‘ pressjoni jingħaluq b'disk li tinfaqa' (pressjoni tat-tifqigħ ta' madwar 2 200 kPa) miżmuma fil-post b'plagg li jżomm li jkollu ħofra ta' 20 mm. Jekk meħtieġ, siġill inert jintuża mal-plagg li jqabbad sabiex jiżgura rabta tajba li ma jgħaddix gass minnha. Stend ta' frid (il-figura 2) iservi sabiex iżomm l-immuntar fil-pożizzjoni t-tajba matul l-użu. Dan normalment ikun jinkludi pjanċa ta' l-azzar artab b'kejl ta' 235 mm × 184 mm × 6 mm u 185 mm tul b'sezzjoni kwadra mħaffra (S.H.S.) 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Sezzjoni tkun maqtugħa minn kull wieħed mill-ġnub opposti fit-tarf ta' l-S.H.S. hekk li tirriżulta struttura b'żewġ saqajn bil-ġenb ċatt li fuqha tistrieħ *box section* intatta b'tul ta' 86 mm. It-truf ta' dawn il-ġnub ċatti huma maqtugħa għal angolu ta' 60° mal-lat orizzontali u iwweldjati mal-pjanċa tal-qiegħ. Qasma bil-kejl ta' 22 mm wisa' x 46 mm fond tinqata’ b'mod mekkaniku fuq naħa waħda fit-tarf ta' fuq tas-sezzjoni tal-qiegħ hekk li l-immuntar tar-reċipjent ta' pressjoni jitniżżel, it-tarf tal-plagg li jqabbad jiddaħħal l-ewwel, fil-*box section* ta' l-irfid tas-sezzjoni, bid-driegħ tal-ġenb akkomodat f'dik il-qasma. Biċċa azzar 30 mm wisa' u 6 mm ħxuna tkun iwweldjata mal-wiċċ intern l-aktar baxx tas-sezzjoni tal-*box section* sabiex taġixxa bħala *spacer*. Żewġ skorfini *butterfly,* bil-kamin fuq il-wiċċ oppost, iservu sabiex iżommu r-reċipjent ta' pressjoni f'pożizzjoni soda. Żewġ strippi 12 mm wiesa' magħmulin minn azzar ta' 6 mm ħxuna, iwweldjati mal-biċċiet tal-ġenb li joħorġu mill-bażi tal-*box section*, jirfdu r-reċipjent tal-pressjoni minn taħt.

▼B

1.6.1.2.2 Sistema li tagħti n-nar

Is-sistema li tagħti n-nar tikkonsisti minn wajer ta' Ni/Cr twil 25 cm b'dijametru ta' 0,6 mm u b'reżistenza ta' 3,85 ohm/m. Il-wajer jinbaram, bl-użu ta' virga b'dijametru ta' 5 mm, f'għamla ta' romblu u jintrabat ma' l-elettrodi tal-plagg li jqabbad. Ir-romblu għandu jkollu waħda mill-konfigurazzjonijiet murija fil-figura 3. Id-distanza bejn il-qiegħ tar-reċipjent u l-parti t'isfel tar-romblu li jqabbad għandha tkun 20 mm. Jekk l-elettrodi ma jkunux aġġustabbli, it-trufijiet tal-wajer li jqabbad bejn ir-romblu u l-qiegħ tar-reċipjent għandhom ikunu insulati b'kisja taċ-ċeramika. Il-fil jissaħħan b'kurrent kostanti ta' l-elettriku li jista' jforni mill-anqas 10 A.

1.6.2 **It-twettiq tat-test** ([1])

L-apparat, immuntat kollu kemm hu bit-*transducer* tal-pressjoni u s-sistema tas-sħana imma mingħajr il-plattina li tinfaqa', huwa mirfud bit-tarf tal-plagg li jqabbad fin-naħa t'isfel. 2,5 g mill-likwidu tat-test jitħallat ma' 2,5 g taċ-ċelluloża mnixxfa f'*beaker* tal-ħġieġ bl-użu ta' virga tal-ħġieġ għat-tħawwid ([2]). Bħala prekawzjoni kontra l-periklu, it-tħawwid għandu jitwettaq wara tarka tas-sikurezza bejn l-operatur u t-taħlita. Jekk it-taħlita taqbad matul it-tħawwid jew waqt il-mili, il-kumplament tat-test mhux meħtieġ. It-taħlita tiżdied, fi porzjonijiet żgħar u bit-taptip, fir-reċipjent tal-pressjoni waqt li jkun żgurat li t-taħlita tkun ippakkjata madwar il-bobina li tqabbad u li tkun f'kuntatt tajjeb magħha. Huwa importanti li l-bobina ma titgħaffiġx waqt il-proċess ta' l-ippakkjar minħabba li dan jista' jwassal għal riżultati ħżiena ([3]). Il-plattina ti tinfaqa' titqiegħed f'postha u l-plagg li jżomm jiġi invitat sewwa. Ir-reċipjent kif hekk imħejji jkun trasferit għal fuq l-istand ta' rfid ta' tqabbid, bil-plattina li tinfaqa' fuq in-naħa ta' fuq, u r-reċipjent għandu jkun lokalizzat f'armarju ventilat xieraq jew inkella f'ċellula li tqabbad. L-għejun ta' l-elettriku jintrabat mat-trufijiet esterni tal-plagg li jqabbad u jiġu applikati 10 A. Il-ħin minn meta jibda t-taħlit u jinxteħel l-elettriku m'għandux jeċċedi l-10 minuti.

Is-sinjal prodott mit-*transducer* tal-pressjoni jkun irreġistrat fuq sistema xierqa li tippermetti kemm il-valutazzjoni u kif ukoll il-ġenerazzjoni ta' reġistrazzjoni permanenti tal-profil tal-ħin mal-pressjoni (eż. reġistratur b'kurrent qasir ma' reġistratur *chart*). It-taħlita tissaħħan sakem il-plattina li tinfaqa' tinkiser jew sakemm mill-anqas ikunu għaddew 60 s. Jekk il-plattina li tinfaqa' ma tinkisirx, it-taħlita għandha titħalla tibdred qabel ma, b'galbu kbir, l-apparat jiżżarma, billi jittieħdu l-prekawzjonijiet għal xi forza ta' pressjoni li jista jkun hemm. Għandhom jitwettqu ħames provi bis-sustanza tat-test u bis-sustanza(i) tar-referenza. Il-ħin meħtieġ sabiex il-pressjoni titla' minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar mill-pressjoni atmosferika għandu jkun innotat. Il-ħin taż-żieda medja fil-pressjoni tkun ikkalkulata.

F'ċerti każijiet, is-sustanzi jistgħu jiġġeneraw żieda fil-pressjoni (għolja wisq jew baxxa wisq), minħabba r-reazzjonijiet kimiċi li ma jkunux jikkaratterizzaw il-proprjetajiet ossidanti tas-sustanza. F'dawn il-każijiet, jista' jkun hemm il-ħtieġa li jkun ripetut it-test b'sustanza inerta, eż. diatomit (*kieselguhr*), minflok iċ-ċelluloża, sabiex tkun iċċarata n-natura tar-reazzjoni.

([1]) Taħlitiet ta' ossidanti maċ-ċelluloża għandhom jitqiesu bħala potenzjalment esplożiv u għandhom jintużaw bil-galbu xieraq.

([2]) Fil-prattika dan jista' jsir bil-preparament ta' taħlita ta' 1:1 ta' likwidu għat-test u ċelluloża f'ammont akbar milli meħtieġ għat-test u bit-trasferiment ta' 5 ± 0,1 g fir-reċipjent tal-pressjoni. It-taħlita għandha tiġi ppreparata friska għal kull esperiment.

([3]) B'mod partikolari, il-kuntatt bejn it-tidwiriet ta' ħdejn xulxin tal-bobina għandu jiġi evitat.

▼B

2. **DATA**

Il-ħinijiet taż-żieda fil-pressjoni kemm għas-sustanza tat-test u wkoll għas-sustanza(i) ta' referenza. Il-ħinijiet taż-żieda fil-pressjoni għat-testijiet b'sustanza inerta, jekk imwettqa.

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Il-ħinijiet taż-żieda fil-pressjoni kemm għas-sustanza tat-test u wkoll għas-sustanza(i) ta' referenza jkunu ikkalkulati.

Il-ħinijiet taż-żieda fil-pressjoni għat-testijiet b'sustanza inerta, (jekk imwettqa) jkunu ikkalkulati.

Uħud mill-eżempji tar-riżultati huma murija fit-Tabella 1

Tabella 1

Eżempji tar-riżultati [a]

Sustanza [b]	Il-ħin taż-żieda medja fil-pressjoni ta' taħlita ta' 1:1 maċ-ċelluloża (ms)
Dikromat ta' l-ammonju, taħlita saturata fl-ilma	20 800
Nitrat tal-kalċju, taħlita saturata fl-ilma	6 700
Nitrat ferriku, taħlita saturata fl-ilma	4 133
Perklorat tal-litjum, taħlita saturata fl-ilma	1 686
Perklorat tal-magneżju, taħlita saturata fl-ilma	777
Nitrat tan-nikil, taħlita saturata fl-ilma	6 250
Aċidu nitriku, 65 %	4 767 [c]
Aċidu perkoriku, 50 %	121 [c]
Aċidu perkoriku, 55 %	59
Nitrat tal-potassju, 30 % taħlita fl-ilma	26 690
Nitrat tal-fidda, taħlita saturata fl-ilma	— [d]
Klorat tas-sodju, 40 % taħlita fl-ilma	2 555 [c]
Nitrat tas-sodju, 45 % taħlita fl-ilma	4 133
Sustanza inerta	
Ilma:Ċelluloża	— [d]

[a] ara r-referenza (1) għall-klassifika skond l-iskema tat-trasport tan-NU.
[b] Is-soluzzjonijiet saturati għandhom jitħejjew f'20 °C.
[c] Valur medju minn esperimenti komparattivi minn laboratorji differenti.
[d] Il-pressjoni massima ta' 2 070 kPA ma ntlaħqitx.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1 RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-identità, il-kompożizzjoni, il-purità, eċċ. tas-sustanza għat-test;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— il-proċedura użata għat-tnixxif taċ-ċelluloża;

— il-kontenut ta' l-ilma użat fiċ-ċelluloża;

— ir-riżultati tal-kejl;

— ir-riżultati mit-testijiet b'sustanza inerta, jekk ikun hemm;

— il-ħinijiet medji taż-żieda fil-pressjoni kkalkulati;

— xi devjazzjonijiet minn dan il-metodu u r-raġunijiet ta' dawn;

— l-informazzjoni addizzjonali kollha, jew ir-rimarki, dwar l-interpretazzjoni tar-riżultati;

3.2 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI ([1])

Ir-riżultati tat-test huma vvalutati fuq il-bażi ta':

a) jekk it-taħlita tas-sustanza għat-test u ċ-ċelluloża jaqbdux b'mod spontanju; u

b) il-paragun fil-ħin medju meħtieġ sabiex il-pressjoni titla' minn 690 kPa għal 2 070 kPa, mas-sustanza(i) ta' referenza.

Sustanza likwida għandha titqies ossidanti, meta:

a) taħlita 1:1, fil-piż, tas-sustanza u ċ-ċelluloża taqbad b'mod spontanju; jew

b) taħlita 1:1, fil-piż, tas-sustanza u ċ-ċelluloża turi żieda fil-ħin tal-medja tal-pressjoni li tkun anqas minn jew ugwali għal, żieda fil-ħin għal taħlita 1:1 fil-piż, ta' 65 % (w/w) aċidu nitriku fl-ilma u ċelluloża.

Sabiex ikunu evitati riżultati pożittivi foloz, ir-riżultati mogħtija meta tiġi ttestjata s-sustanza għat-test ma' materjal inert, għandhom jitqiesu wkoll fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

([1]) Ara r-referenza 1 għall-interpretazzjoni tar-riżultati skond ir-regolamenti għat-trasport tan-NU bl-użu ta' bosta sustanzi ta' referenza.

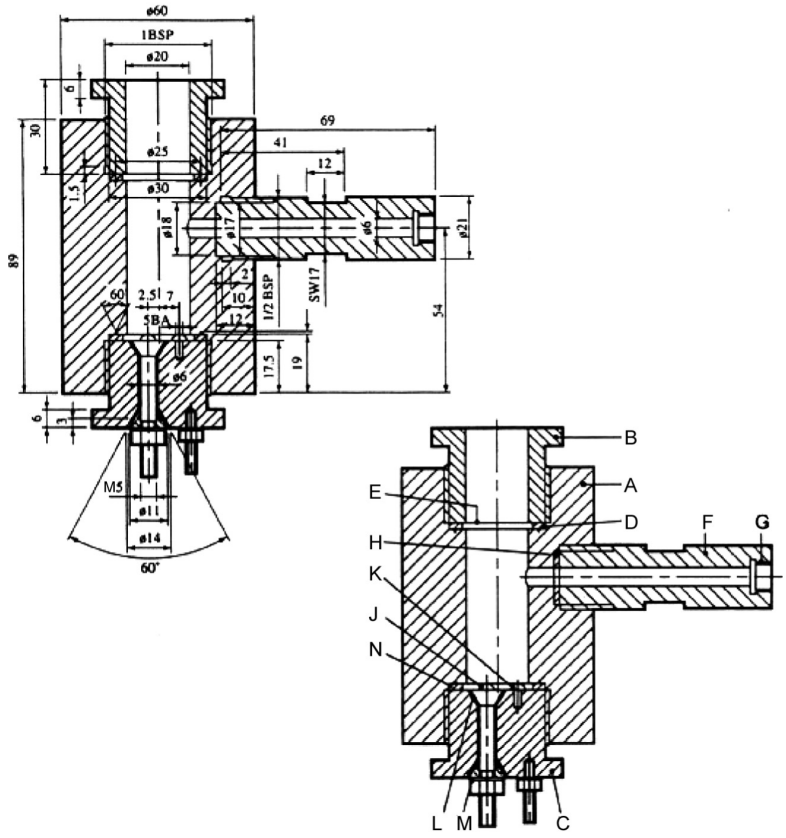
▼B

4. **REFERENZI**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. It-tielet edizjoni riveduta. Pubblikazzjoni tal-NU, Nru.: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, paġna 342. Test O.2: Test għall-likwidu ossidanti

Figura 1

Reċipjent tal-Pressjoni



(A) Il-qafas tar-reċipjent tal-pressjoni

(B) Il-plagg li jżomm id-disk li jinfaqa'

(C) Il-plagg li jqabbad

(D) Washer minn ċomb artab

(E) Id-disk li jinfaqa'

(F) Id-driegħ tal-ġenb

(G) Ir-ras tat-transducer tal-pressjoni

(H) Il-washer

(J) L-elettrodu bl-in-sulazzjoni

(K) L-elettrodu ma' l-earth

(L) L-insulazzjoni

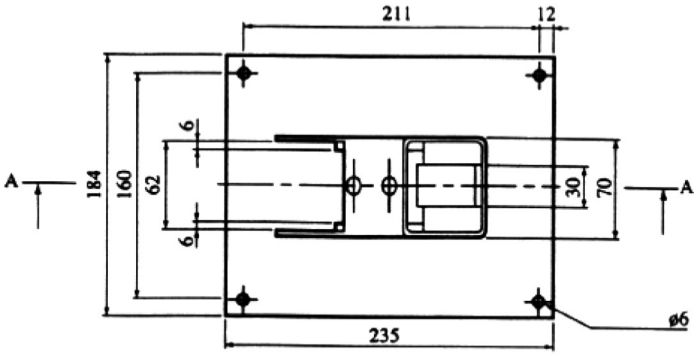
(M) Il-kona ta' l-azzar

(N) Il-kanal li jobronn il-washer

▼B

Figura 2

Stend għall-irfid



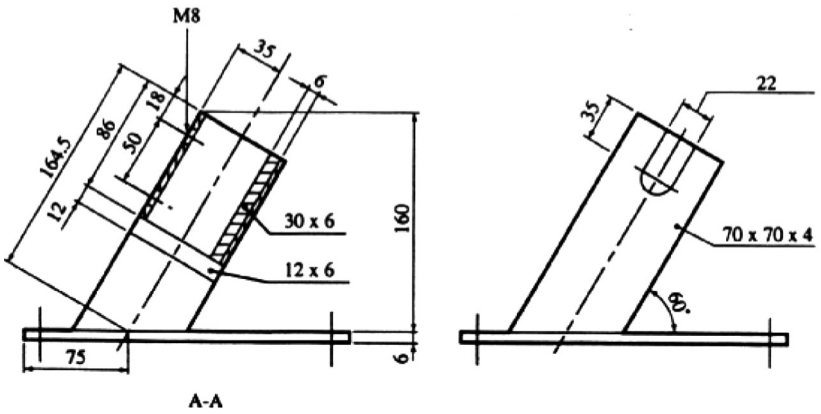
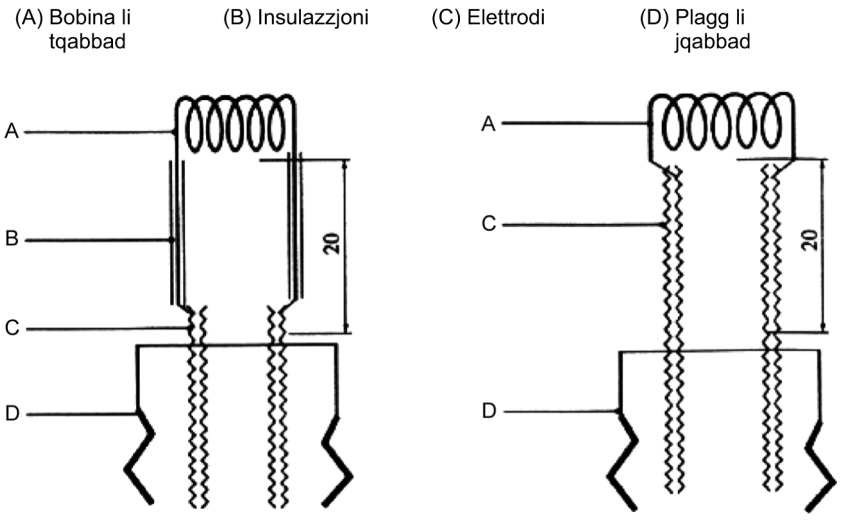


Figura 3

Sistema li tqabbad



Nota: tista' tintuża kwalunkwe konfigurazzjoni minn dawn.

▼M1

A.22. **ID-DIJAMETRU MEDJU ĠEOMETRIKU TAL-FIBRI PEŻAT SKONT IT-TUL TAGĦHOM**

1. **IL-METODU**

1.1. DAĦLA

Dan il-metodu jiddeskrivi proċedura li tkejjel id-Dijametru Medju Ġeometriku Peżat Skont it-Tul [Length Weighted Geometric Mean Diameter] (LWGMD) ta' massa ta' Fibri Minerali Magħmula mill-Bniedem [Man Made Minerla Fibres] (MMMF). Minħabba li l-LWGMD tal-popolazzjoni se jkollha probabbiltà ta' 95 % li tkun bejn il-livelli ta' kunfidenza ta' 95 % (LWGMD ± żewġ devjazzjonijiet standard) tal-kampjun, il-valur irrapportat (il-valur tat-test) se jkun l-inqas limitu ta' kunfidenza ta' 95 % tal-kampjun (iġifieri LWGMD — 2 devjazzjonijiet standard). Il-metodu huwa bbażat fuq aġġornament (Ġunju 1994) ta' abbozz ta' proċedura industrijali HSE maqbula fil-laqgħa bejn l-ECFIA u l-HSE f'Chester fis-26/9/93 u żviluppat għal u permezz ta' tieni prova interlaboratorja (1, 2). Dan il-metodu ta' kejl jista' jintuża sabiex jikkaratterizza d-dijametru tal-fibra ta' sustanzi tal-massa jew prodotti li fihom l-MMMFs u jinkludu fibri ta' ċeramika refrattarja (RCF), fibri tal-ħġieġ magħmula mill-bniedem (MMVF), u fibri tal-kristallina u l-polikristallina.

L-ippeżar tat-tul huwa mod ta' kumpens għall-effett fuq id-distribuzzjoni tad-dijametru kkawżata bit-tkissir ta' fibri twal meta jkunu qed isiru l-kampjuni jew jitmiss il-materjal. Tintuża statistika ġeometrika (medja ġeometrika) sabiex tkejjel id-distribuzzjoni tad-daqs tad-dijametri tal-MMMF għaliex ġeneralment dawn id-dijametri jkollhom distribuzzjonijiet tad-daqs li jqarbu n-norma logaritmika.

Il-kejl tat-tul kif ukoll tad-dijametru huwa tedjanti u jieħu ħafna ħin imma, jekk jitkejlu biss dawk il-fibri li jmissu linja infinitament irqieqa fuq il-firxa viżiva ta' SEM, imbagħad il-probabbiltà li tingħażel waħda mill-fibri tkun proporzjonali għat-tul tagħha. Minħabba li b'hekk jitqies it-tul fil-kalkoli tal-ippeżar tat-tul, l-uniku kejl meħtieġ huwa d-dijametru u l-LWGMD-2SE jista' jkun ikkalkulat kif deskritt.

1.2. TIFSIRIET

Il-partikula: Oġġett li għandu proporzjon bejn it-tul u l-wisa' ta' inqas minn 3:1.

Il-fibra: Oġġett li għandu proporzjon bejn it-tul u l-wisa' (aspect ratio) mill-inqas 3:1.

1.3. AMBITU U LIMITAZZJONIJIET

Il-metodu huwa ddisinjat sabiex janalizza d-distribuzzjoni ta' dijametri li jkollhom valur medja bejn 0,5 μm u 6 μm. Dijametri ikbar jistgħu jitkejlu bl-użu ta' ingrandimenti minn SEM iktar baxxi iżda l-metodu se jkun dejjem iktar limitat fid-distribuzzjonijiet tal-fibra iktar fini u jekk id-dijametru medjan ikun inqas minn 0,5 μm, huwa rrakkomandat kejl permezz ta' TEM (transmission electron microscope).

▼M1

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-ITTESTJAR

Numru ta' kampjuni rappreżentattivi tal-qalba jittieħdu mill-kutra tal-fibra jew jiġu mislutin mill-massa tal-fibra. Il-fibri tal-massa jitqassru bl-użu ta' proċedura tat-tifrik u sottokampjun rappreżentattiv mxerred fl-ilma. Il-biċċiet jiġu estratti u ffiltrati minn filtru tal-polikarbonat b'pori tad-daqs 0,2 μm u jiġu ppreparati għal analiżi bl-użu ta' tekniki tal-iscanning electron microscope (SEM). Id-dijametri tal-fibri jitkejlu taħt ingrandiment tal-iskrin ta' × 10 000 jew ikbar ([1]) bl-użu ta' metodu ta' interċetazzjoni tal-linja sabiex tittieħed stima imparzjali tad-dijametru medjan. L-inqas intervall tal-kunfidenza ta' 95 % (ibbażat fuq test unilaterali) jiġi kkalkulat sabiex issir stima tal-iżjed valur baxx tal-medju ġeometriku tad-dijametru tal-fibra tal-materjal.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-ITTESTJAR

1.5.1. **Il-prekawzjonijiet / is-sikurezza**

L-espożizzjoni tal-persuni għall-fibri fl-arja għandha tkun imminimizzata u għandha tintuża vetrina li tkun mgħammra b'ventilatur għall-estrazzjoni jew kaxxa mgħammra bl-ingwanti sabiex isir kuntatt mal-fibri niexfa. Għandu jitwettaq monitoraġġ prejodiku tal-espożizzjoni tal-persuna sabiex tiġi determinata l-effikaċja tal-metodi ta' kontroll. Meta jisir kuntatt mal-MMMFs għandhom jintlibsu l-ingwanti li jintremew sabiex tonqos l-irritazzjoni tal-ġilda u tkun evitata l-kontaminazzjoni min-naħa għall-oħra.

1.5.2. **L-apparat / it-tagħmir**

— Pressa u dadi tal-mastri (b'kapaċità li jipproduċu 10 MPa).

— filtri kapillari tal-polikarbonat bid-daqs tal-pori ta' 0,2 μm (dijametru ta' 25 mm).

— filtru ta' membrana tal-ester taċ-ċelluloża bid-daqs tal-pori ta' 5 μm sabiex jintuża bħala filtru tal-appoġġ.

— Apparat tal-ħġieġ għall-filtrazzjoni (jew sistemi tal-filtrazzjoni li jintremew) li jieħu filtri li għandhom dijametru ta' 25 mm (eż. Millipore glass microanalysis kit, tat-tip nru XX10 025 00).

— Ilma li jkun għadu kemm ġie ddistallat, iffiltrat minn filtru bid-daqs tal-pori ta' 0,2 μm sabiex jitneħħew il-mikro-organiżmi.

— Pulverizzatur li jkopri d-deheb jew deheb u palladju.

— Scanning electron microscope li kapaċi jirrisolvi sa' 10 nm u jkabbar b'10 000.

— Mixxellanji: spatuli, xafra tal-iskarpell tat-tip 24, pinzetta, tubi tas-SEM, kolla tal-karbonju jew tejp adeżiv tal-karbonju, irbaba tal-fidda.

— Sonda ultrasonika jew banju ultrasoniku li joqgħod fuq bank

— Core sampler jew cork borer, sabiex jieħu l-kampjuni tal-qalba mill-kutra tal-MMMF

([1]) Dan il-valur ta' ingrandiment huwa indikat għall-fibri tad-daqs 3 μm, għall-fibri tad-daqs 6 μm ingrandiment ta' × 5 000 jaf ikun aħjar.

▼M1

1.5.3. **Il-Proċedura tat-test**

1.5.3.1. *It-teħid tal-kampjuni*

Jintuża core sampler ta' 25 mm jew cork borer sabiex jittieħdu kampjuni tal-profil trasversali. Dawn għandhom ikunu spazjati b'mod ekwu matul il-wisa' ta' tul qasir tal-kutra jew meħuda minn partijiet sporadiċi jekk ikun hemm biċċiet twal tal-kutra disponibbli. L-istess tagħmir jista' jintuża sabiex jiġu estratti kampjuni sporadiċi minn fibri maħlula. Meta huwa possibli għandhom jittieħdu sitt kampjuni, sabiex jirriflettu l-varjazzjonijiet tal-ispazju fil-materjal tal-massa.

Is-sitt kampjuni tal-qalba għandhom jitfarku b'dada li jkollha dijametru ta' 50 mm b'10 Mpa. Il-materjal jitħallat bi spatula u jerġa jiġi ppressat b'10 Mpa. Il-materjal imbagħad jitneħħa mid-dada u jinħażen fi flixkun tal-ħġieġ issiġillat.

1.5.3.2. *Il-Preparazzjoni tal-Kampjun*

Fejn jeħtieġ, tista' titneħħa il-kopertura organika li taqqad billi l-fibra titqiegħed ġo forn b'temperatura ta' 450 grad C għal madwar siegħa.

Sabiex ikun sottodiviż il-kampjun għandu jinqasam f'kon u fi kwarti (dan għandu jsir ġewwa vetrina tat-trab).

Bl-użu ta' spatula, żid ammont żgħir (< 0,5 g) tal-kampjun ma' 100 ml ilma li jkun għadu kemm ġie ddistillat u ffiltrat minn ġo filtru b'membrana ta' 0,2 μm (sorsi alternattivi ta' ilma purissimu jistgħu jintużaw, jekk jirriżulta li huma xierqa). Ħallat sew bl-użu ta' sonda ultrasonika li topera b'saħħa ta' 100 W u intunata sabiex tifforma ħofra fl-istruttura. (Jekk ma tkunx disponibbli sonda uża l-metodu li ġej: ċaqlaq l'hemm u l'hawn u dawwar repetittivament għal madwar 30 sekonda; qiegħdu f'banju ultrasoniku li joqgħod fuq bank għal madwar ħames minuti; imbagħad ċaqalqu l'hemm u l'hawn u dawwru repetittivament għal madwar 30 sekonda oħra).

Eżatt wara t-tixrid tal-fibra, neħħi numru ta' alikwoto (eż. tliet alikwoti ta' 3, 6 u 10 ml) bl-użu ta' pipetta bl-għonq wiesa (li tesa' 2-5 ml).

Iffiltra f'vakum kull alikwota b'filtru tal-polikarbonat ta' 0,2 μm appoġġjat b'filtru tal-appoġġ li għandu pora MEC ta' 5 μm, bl-użu ta' lenbut tal-filtrazzjoni tal-ħġieġ ta' 25 mm li jkollu depożitu tal-likwidu ċilindriku. Fil-lenbut għandhom jitqegħdu madwar 5 ml ta' ilma distillat iffiltrat u l-alikwot titqiegħed bil-mod fl-ilma bl-użu tal-pipetta fejn il-ponta tagħha tinżamm taħt il-menisku. Il-pipetta u d-depożitu tal-likwidu iridu jiġu mlaħalħa sew wara dan il-proċess bil-pipetta, għaliex il-fibri irqaq għandhom tendenza li jkunu iżjed fil-wiċċ.

B'attenzjoni neħħi l-filtru u sseparah mill-filtru tal-appoġġ qabel ma' tqiegħdu f'kontenitur biex jinxef.

▼M1

Aqta sezzjoni daqs ta' kwart jew nofs tad-depożitu ffiltrat b'xafra tal-iskarpell tat-tip 24 b'moviment 'l hinn u 'l hawn tal-id. B'attenzjoni waħħal is-sezzjoni maqtuha ma' trej tas-SEM permezz ta' tejp tal-karbonju jew kolla tal-karbonju. Għandhom jiġu applikati l-irbaba tal-fidda f'tal-inqas tliet pożizzjonijiet sabiex jittejjeb il-kuntatt eletriku fit-truf tal-filtru u tat-trej. Meta l-kolla / l-irbaba tal-fidda tinxef/jinxfu, bil-pulverizzatur agħmel kopertura ta' madwar 50 nm ta' deheb jew deheb u palladju fuq il-wiċċ tad-depożitu.

1.5.3.3. *Il-kalibrar tas-SEM u l-operat*

1.5.3.3.1. Il-kalibrar

Il-kalibrar tas-SEM għandu jkun ikkontrollat tal-inqas darba fil-ġimgħa (idealment darba kuljum) bl-użu ta' xibka tal-kalibrazzjoni ċċertifikata. Il-kalibrar għandu jkun ikkontrollat skont standard iċċertifikat u jekk il-valur mkejjel (SEM) ma jkunx f'medda ta' ± 2 % tal-valur iċċertifikat, il-kalibrar tas-SEM irid ikun aġġustat u jerġa jkun ikkontrollat.

Is-SEM irid ikun kapaċi jirrisolvi tal-inqas dijametru b'viżibbiltà minima ta' 0,2 μm, bl-użu ta' matriċi ta' kampjun reali, b'ingrandiment ta' x 2 000.

1.5.3.3.2. L-operat

Is-SEM għandu jkun operat fuq ingrandiment ta' 10 000 ([1]) bl-użu ta' kundizzjonijiet li jagħtu reżoluzzjoni tajba b'immaġini aċċetabbli b'rati baxxi ta' skan bħal, per eżempju, 5 sekondi għal kull ritratt. Għalkemm il-ħtiġijiet tal-operat ta' SEMs differenti jistgħu ivarjaw, ġeneralment sabiex tinkiseb l-aħjar viżibbiltà u reżoluzzjoni, b'materjali li relattivament għandhom daqs atomiku żgħir, għandhom jintużaw vultaġġi t'aċċelerazzjoni ta' bejn 5-10 keV issetjati fuq tikka ta' daqs żgħir u distanza tax-xogħol qasira. Meta jkun qiegħed isir it-travers lineari, għandha tintuża inklinazzjoni ta' 0^{o} sabiex ikun minimizzat il-bżonn li terġa tiffoka jew, jekk is-SEM għandu stage ewċentrika, għandha tintuża l-istage ewċentrika Jista' jintuża ingrandiment iktar baxx jekk il-materjal m'għandux fibri (b'dijametru) żgħar u d-dijametri tal-fibri huma kbar (> 5 μm)

1.5.3.4. *Il-kejl tad-daqs*

1.5.3.4.1. Eżami taħt ingrandiment baxx sabiex ikun ivvalutat l-kampjun

Fil-bidu l-kampjun għandu jiġi eżaminat taħt ingrandiment baxx sabiex isir tfittix għal evidenza ta' tagħqid ta' fibri kbar u sabiex issir valutazzjoni tad-densità tal-fibri. Fil-każ ta' wisq għoqod huwa rrakomandat li jiġi ppreparat kampjun ġdid.

Huwa meħtieġ li jitkejjel numru minimu ta' fibri għall-korettezza fl-istatistika u d-densità għolja tal-fibri taf tkun mixtieqa għaliex l-eżaminazzjoni tal-partijiet vojta tieħu ħafna ħin u ma tagħtix kontribut għall-analiżi. Madankollu, jekk il-filtru ikun mimli wisq, isir diffiċli biex jitkejlu l-fibri kollha li jistgħu jiġu mkejla u, peress li li l-fibri ż-żgħar jistgħu jinħbew wara oħrajn li huma ikbar, tista' ma tindunax bihom.

([1]) Għall-fibri tad-daqs 3 μm, ara n-nota ta' qabel.

▼M1

Il-parzjalità lejn stima eċessiva tal-LWGMD tista' tirriżulta minn fibri li għandhom densità ta' iktar minn 150 fibra f'kull millimetru tal-linja traversa. Minn naħa l-oħra, il-konċentrazzjonijiet tal-fibra baxxi jżidu l-ħin tal-analiżi u, spiss, finanzjarjament ikun jaqbel li jiġi ppreparat kampjun b'densita tal-fibra iżjed viċin l-ottimu milli tkompli bl-għadd ta' filtri li għandhom konċentrazzjoni baxxa. L-aħjar densità tal-fibra għandha tagħti medju ta' madwar fibra waħda jew tnejn f'kull firxa viżiva taħt ingrandiment ta' x 5 000. Minkejja dan, l-aħjar densità tiddependi fuq id-daqs (dijametru) tal-fibri, għalhekk jeħtieġ li l-operatur juża xi ġudizzju espert sabiex jiddeċidi jekk id-densità tal-fibra hijiex ottima jew le.

1.5.3.4.2. L-ippeżar skont it-tul tad-dijametri tal-fibri

Jingħaddu biss dawk il-fibri li jmissu (jew jaqsmu) linja (infinitament) rqiqa mpinġija fuq l-iskrin tas-SEM. Għal din ir-raġuni titpinġa linja orizzontali (jew vertikali) fiċ-ċentru tal-iskrin.

Alternattivament jitqiegħed punt uniku fiċ-ċentru tal-iskrin u jiġi inizjat skan kontinwu f'direzzjoni waħda matul il-filtru. Kull fibra li għandha aspect ratio ikbar minn 3:1 li tmiss jew taqsam dan il-punt ikollha d-dijametru mkejjel u rreġistrat.

1.5.3.4.3. Il-kejl tad-daqs tal-fibra

Huwa rrakkomandat li jiġu mkejla minimu ta' 300 fibra. Kull fibra tiġi mkejla darba biss fil-punt tal-intersezzjoni mal-linja jew il-punt impinġi fuq l-immaġini (jew viċin tal-punt tal-intersezzjoni jekk it-truf tal-fibri huma moħbija). Jekk tiltaqa' ma' fibri li għandhom profil sezzjonali mhux uniformi, għandu jintuża kejl li jirrapreżenta l-medju tad-dijametru tal-fibra. Għandha tingħata attenzjoni għal kif jiġi definit it-tarf u kif tiġi mkejla l-iqsar distanza bejn it-truf tal-fibra. Il-kejl tad-daqs jista' jsir on-line, jew off-line fuq immaġini jew ritratti maħżuna. Huma rrakkomandati sistemi semi awtomatiċi li jkejlu l-immaġini li jniżżlu d-dejta direttament fuq spreadsheet, għaliex inaqqsu t-telf ta' ħin, jeliminaw l-iżbalji tat-traskrizzjoni u l-kalkoli jistgħu jiġu awtomatizzati.

It-truf tal-fibri twal għadhom ikunu kkontrollati taħt ingrandiment baxx sabiex tiżgura li mhux qed jinbarmu lura ġol-firxa viżiva u qed jiġu mkejla darba biss.

2. **ID-DEJTA**

2.1. IT-TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Normalment, iddijametri tal-fibri ma jkollhomx distribuzzjoni normali. Madankollu, permezz ta' trasformazzjoni logaritmika jkun possibbli li tikseb distribuzzjoni li toqrob aktarlejn in-normal.

Ikkalkula l-medju aritmetiku (medju lnD) u d-devjazzjoni standard (SD_{lnD}) tal-logaritmu ta' valuri tal-bażi e (lnD) tad-dijameteri (D) ta' n fibri..

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Iddividi d-devjazzjoni standard bir-radiċi kwadrata tan-numru (n) ta' kejl differenti sabiex tikseb id-devjazzjoni standard (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Naqqas għal darbtejn il-valur tad-devjazzjoni standard mill-medju u kkalkula l-esponenzjali ta' dan il-valur (il-medju bit-tnaqqis ta' żewġ devjazzjonijiet standard) sabiex toħroġ il-medju ġeometriku bit-tnaqqis ta' żewġ devjazzjonijiet standard ġeometriċi.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas it-tagħrif li ġej:

— Il-valur tal-LWGMD-2SE.

— Kwalunkwe devjazzjoni u b'mod partikolari dawk li jista' jkollhom effett fuq il-preċiżjoni jew il-korettezza tar-riżultati bil-ġustifikazzjonijiet xierqa.

4. **IR-REFERENZI**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 KOEFFIĊJENT TAL-PARTIZZJONI (1-Ottanol/Ilma): METODU TA' THAWWID BIL-MOD

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 123 (2006) tal-OECD. Il-valuri ta' koeffiċjent tal-partizzjoni (P_{OW}) ta' 1-ottanol/ilma sa log P_{OW} ta' 8.2 ġew iddeterminati b'mod korrett bil-metodu ta' tħawwid bil-mod (1). Għalhekk dan huwa approċċ sperimentali adattat għad-determinazzjoni diretta ta' P_{OW} ta' sustanzi idrofobiċi ħafna.

2. Metodi oħra għad-determinazzjoni tal-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma (P_{OW}) huma l-metodu ta' "tħawwid tal-flixkun" (2), u d-determinazzjoni tal-P_{OW} minn mġiba ta' ritenzjoni ta' HPLC ta' fażi inversa (3). Il-metodu ta' "tħawwid tal-flixkun" għandu tendenza għal oġġetti estraneji (artifacts) minħabba t-trasferiment ta' taqtiriet mikro ta' ottanol fil-fażi fl-ilma. B'valuri jiżdiedu tal-P_{OW} il-preżenza ta' dawn it-taqtiriet fil-fażi fl-ilma twassal għal stima eċċessiva dejjem tiżdied tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fl-ilma. Għalhekk, l-użu tiegħu huwa limitat għal sustanzi b'log $P_{OW} < 4$. It-tieni metodu joqgħod fuq dejta solida ta' valuri P_{OW} iddeterminati direttament biex jikkalibraw ir-relazzjoni bejn mġiba ta' ritenzjoni ta' HPLC u valuri P_{OW} imkejla. Abbozz tal-linja gwida tal-OECD kien disponibbli biex ikunu ddeterminati l-koeffiċjenti tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma ta' sustanzi jonizzabbli (4) iżda m'għandhiex tibqa' tintuża.

3. Dan il-Metodu ta' Ttestjar kien żviluppat fil-Pajjiżi l-Baxxi. Il-preċiżjoni tal-metodi deskritti hawn kienet ivvalidata u ottimizzata fi studju ta' validazzjoni ta' ring-test li fih kienu ħadu sehem 15-il laboratorju (5).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

Sinifikat u użu

4. Għal sustanzi organiċi inerti nstabu relazzjonijiet sinifikanti ħafna bejn koeffiċjenti tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma (P_{OW}) u l-akkumulazzjoni bijoloġika tagħhom fil-ħut. Minbarra dan, intwera li l-P_{OW} huwa korrelatat mat-tossiċità fil-ħut, kif ukoll ma' sorbiment ta' kimiċi għal solidi bħall-ħamrija u s-sedimenti. Fir-referenza (6) ingħatat ħarsa ġenerali estensiva tar-relazzjonijiet.

5. Kienet stabbilita varjetà wiesgħa ta' relazzjonijiet bejn il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma u proprjetajiet oħra ta' sustanzi ta' rilevanza għat-tossikoloġija ambjentali u l-kimika. Bħala konsegwenza, il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma evolva bħala parametru ewlieni fil-valutazzjoni tar-riskju ambjentali tal-kimiċi, kif ukoll fit-tbassir ta' x'jista' jiġri mill-kimiċi fl-ambjent.

Kamp ta' applikazzjoni

6. L-esperiment ta' tħawwid bil-mod jitqies li jnaqqas il-formazzjoni ta' taqtiriet mikro minn taqtiriet ta' 1-ottanol fil-fażi tal-ilma. Bħala konsegwenza, ma jkunx hemm stima eċċessiva ta' konċentrazzjoni fl-ilma minħabba molekuli ta' sustanza għall-ittestjar assoċjati ma' taqtiriet bħal dawn. Għalhekk il-metodu ta' tħawwid bil-mod huwa partikolarment adattat għad-determinazzjoni ta' P_{OW} għal sustanzi b'valuri mistennija ta' log P_{OW} ta' 5 u ogħla, li għalihom il-metodu ta' tħawwid tal-flixkun (2) ikollu tendenza li jrendi riżultati żbaljati.

▼M4

DEFINIZZJONI U UNITAJIET

7. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' sustanza bejn ilma u solvent lipofiliku (1-ottanol) jikkaratterizza d-distribuzzjoni tal-ekwilibriju tal-kimika bejn iżżewġ fażijiet. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni bejn l-ilma u 1-ottanol (P_{OW}) huwa definit bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjonijiet ta' ekwilibriju tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol issaturat bl-ilma (C_O) u ilma ssaturat b'1-ottanol (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Bħala proporzjon ta' konċentrazzjonijiet m'għandux dimensjoni. Spiss jingħata l-bħala l-logaritmu għall-bażi 10 (log P_{OW}). P_{OW} huwa dipendenti mit-temperatura u d-dejta rappurtata għandha tinkludi t-temperatura tal-kejl.

PRINĊIPJU TAL-METODU

8. Biex ikun iddeterminat il-koeffiċjent tal-partizzjoni, l-ilma, 1-ottanol u s-sustanza għall-ittestjar ikunu ekwilibrati ma' xulxin f'temperatura kostanti. Wara jkunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza għall-ittestjar fiżżewġ fażijiet.

9. Id-diffikultajiet sperimentali assoċjati mal-formazzjoni ta' taqtiriet mikro matul l-esperiment ta' tħawwid tal-flixkun jistgħu jitnaqqsu fl-esperiment ta' tħawwid bil-mod propost hawn. Fl-esperiment ta' tħawwid bil-mod, l-ilma, 1-ottanol u s-sustanza għall-ittestjar ikunu ekwilibrati f'reattur li jħawwad b 'termostat miegħu. L-iskambju bejn il-fażijiet ikun aċċellerat bit-tħawwid. It-tħawwid jintroduċi turbulenza limitata li ssaħħaħ l-iskambju bejn 1-ottanol u l-ilma mingħajr ma jkunu ffurmati taqtiriet mikro (1).

APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

10. Minħabba li l-preżenza ta' sustanzi, minbarra s-sustanza għall-ittestjar, jistgħu jinfluwenzaw il-koeffiċjent ta' attività tas-sustanza għall-ittestjar, is-sustanza għall-ittestjar għandha tkun ittestjata bħala sustanza pura. Għandha tintuża l-ogħla purezza disponibbli kummerċjalment għall-esperiment ta' partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma.

11. Dan il-metodu japplika għal sustanzi puri li ma jiddisassoċjawx jew li jassoċjaw u li ma jurux attività interfaċjali sinifikanti. Jista' jkun applikat biex ikun iddeterminat il-proporzjon ta' partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma għal sustanzi u taħlitiet bħal dawn. Meta l-metodu jintuża għal taħlitiet, il-proporzjonijiet ta' partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma determinati jkunu kondizzjonaLi u dipendenti mill-kompożizzjoni kimika tat-taħlita ttestjata u mill-kompożizzjoni elettrolitika użata bħala faži fl-ilma. Jekk jittieħdu passi addizzjonali, il-metodu jkun applikabbli wkoll għal komposti li jiddisassoċjaw jew li jassoċjaw (il-paragrafu 12).

12. Minħabba ekwilibriji multipli fl-ilma u f'1-ottanol involuti fil-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma ta' sustanzi li jiddisassoċjaw bħall-aċidi organiċi u l-fenoli, bażijiet organiċi u sustanzi organometalliċi, il-proporzjon ta' partizzjoni 1-ottanol/ilma huwa kostant kondizzjonali dipendenti ħafna mill-kompożizzjoni elettrolitika (7)(8). Id-determinazzjoni tal-proporzjon ta' partizzjoni 1-ottanol/ilma, għalhekk, teħtieġ li l-pH u l-kompożizzjoni elettrolitika jkunu kkontrollati fl-esperiment u rrappurtati. Għandu jkun hemm ġudizzju espert fl-evalwazzjoni ta' dawn il-proporzjonijiet ta' partizzjoni. Billi jintuża l-valur ta' kostant(i) ta' disassoċjazzjoni, ikun meħtieġ li jintgħażlu valuri ta' pH adatti, b'mod li jkun iddeterminat proporzjon ta' partizzjoni għal kull stat ta' jonizzazzjoni. Għandhom jintużaw bafers li ma jikkumplikawx meta jkunu ttestjati komposti organometalliċi (8). B'konsiderazzjoni tat-tagħrif dwar il-kimika fl-ilma (kostanti ta' kumplessazzjoni, kostanti ta' disassoċjazzjoni), il-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jintgħażlu b'mod li tkun tist'a tiġi stmata l-ispeċjazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fil-faži fl-ilma. Is-saħħa jonika għandha tkun identika fl-esperimenti kollha billi jintuża elettrolit bħala sfond.

▼M4

13. Jistgħu jinqalgħu diffikultajiet fit-test meta jsir it-test għal sustanzi b'solubilità fl-ilma baxxa jew b' P_{OW} għoli minħabba l-fatt li l-konċentrazzjonijiet fl-ilma jsiru baxxi ħafna b'mod li d-determinazzjoni akkurata tagħhom tkun diffiċili. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jipprovdi gwida dwar kif tkun ittrattata din il-problema.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA GĦALL-ITTESTJAR

14. Reaġenti kimiċi għandhom ikunu ta' grad analitiku jew ta' purezza ogħla. Huwa rrakkomandat l-użu ta' sustanzi għall-ittestjar mhux b'tikketta, b'kompożizzjoni kimika magħrufa u preferibbilment b'purezza ta' mill-anqas 99 %, jew ta' sustanzi għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika b'kompożizzjoni kimika magħrufa u b'purezza radjukimika. Fil-każ ta' traċċaturi ta' nofs ħajja qasira, għandhom ikunu applikati l-korrezzjonijiet għad-degradazzjoni. Fil-każ ta' sustanzi għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika, għandu jintuża metodu analitiku speċifiku għal kimika biex ikun żgurat li r-radjuattività tkun relatata direttament mas-sustanza għall-ittestjar.

15. Tista' tinkiseb stima ta' log P_{OW} billi jintuża softwer disponibbli kummerċjalment għal stima ta' log P_{OW}, jew billi jintuża l-proporzjon tas-solubilitajiet fiż-żewġ solventi.

16. Qabel ma jsir esperiment ta' tħawwid bil-mod għad-determinazzjoni ta' P_{OW}, għandha tkun disponibbli l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza għall-ittestjar:

(a) formula strutturali;

(b) metodi analitiċi adatti għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza fl-ilma u 1-ottanol;

(c) kostant(i) ta' disassoċjazzjoni ta' sustanzi jonizzabbli (Linja Gwida 112 tal-OECD (9));

(d) solubilità fl-ilma (10);

(e) idroliżi abijotika] (11);

(f) bijodegradabbiltà faċli (12);

(g) pressjoni tal-fwar (13).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Tagħmir u apparat

17. Ikun meħtieġ tagħmir tal-laboratorju standard, b'mod partikolari, dan li ġej:

— jintużaw ħawwadin manjetiċi u vireg manjetiċi li jħawdu miksijin bit-Teflon biex iħawdu l-fażi tal-ilma;

— strumentazzjoni analitika, adattata għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fil-konċentrazzjonijiet mistennija;

— reċipjent għat-tħawwid b'tapp fil-qiegħ. Skont stima tal-log P_{OW} u l-Limitu ta' Detezzjoni (LOD) tal-kompost tat-test, irid jitqies l-użu ta' reċipjent ta' reazzjoni tal-istess ġeometrija akbar minn ta' litru wieħed, biex ikun jista' jinkiseb volum suffiċjenti ta' ilma għall-estrazzjoni u l-analiżi ta' kimika. Dan se jirriżulta f'konċentrazzjonijiet ogħla fl-estratt tal-ilma u b'hekk ikun hemm determinazzjoni analitika aktar affidabbli. Fl-Appendiċi 1 hemm tabella li tagħti stimi tal-volum minimu meħtieġ, il-LOD tal-kompost, l-istima tal-log P_{OW} tiegħu u s-solubilità fl-ilma tiegħu. It-tabella hija bbażata fuq ir-relazzjoni bejn il-log P_{OW} u l-proporzjon bejn is-solubilitajiet f'ottanol u ilma, kif ippreżentat minn Pinsuwan et al. (14):

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

▼M4

fejn

$SR = S_{oct}/S_w$ (fil-molarità);

u r-relazzjoni mogħtija minn Lyman (15) biex titbassar is-solubilità fl-ilma. Solubilitajiet tal-ilma kkalkulati bl-ekwazzjoni mogħtija fl-Appendiċi 1 għandhom jitqiesu bħala l-ewwel stima. Għandu jkun innotat li l-utent huwa liberu li jiġġenera stima tas-solubilità fl-ilma permezz ta' kwalunkwe relazzjoni li titqies li tirrappreżenta aħjar ir-relazzjoni bejn l-idrofobiċità u s-solubilità. Għal komposti solidi, l-inklużjoni ta' punt ta' tidwib fit-tbassir ta' solubilità hija, pereżempju, irrakomandata. F'każ li tintuża ekwazzjoni modifikata, għandu jkun aċċertat li l-ekwazzjoni għall-kalkulazzjoni ta' solubilità f'ottanol tkun għadha valida. Disinn skematiku ta' reċipjent tat-tħawwid imdawwar bil-ħġieġ b'volum ta' madwar litru wieħed jidher fl-Appendiċi 2. Il-proporzjonijiet tar-reċipjent muri fl-Appendiċi 2 kienu ppruvati li kienu favorevoli u għandhom jinżammu meta jintuża apparat ta' daqs differenti;

— huma essenzjali mezzi biex it-temperatura tinżamm kostanti matul l-esperiment ta' tħawwid bil-mod.

18. Ir-reċipjenti għandhom ikunu magħmulin minn materjal inert b'mod li l-assorbiment mill-uċuħ tar-reċipjenti jkun negliġibbli.

Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet għat-test

19. Id-determinazzjoni tal-P_{OW} għandha ssir b'1-ottanol tal-ogħla purezza li jkun disponibbli kummerċjalment (mill-anqas + 99 %). Hija rrakkomandata purifikazzjoni ta' 1-ottanol b'estrazzjoni bl-aċidu, bażi u ilma u sussegwentement bi tnixxif. Flimkien ma' dan, tista' tintuża distillazzjoni għall-purifikazzjoni ta' 1-ottanol. Għandu jintuża 1-ottanol ippurifikat biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet standard tas-sustanzi għall-ittestjar. L-ilma li għandu jintuża fid-determinazzjoni ta' P_{OW} għandu jkun ħġieġ jew quartz distillat, jew miksub minn sistema ta' purifikazzjoni, jew jista' jintuża ilma ta' grad HPLC. Tkun meħtieġa filtrazzjoni permezz ta' filtru ta' 0,22 μm għall-ilma distillat, u għandhom ikunu inklużi in bjanki biex ikun ivverifikat li fl-estratti konċentrati ma hemmx impuritajiet li jistgħu jkunu ta' tfixkil għas-sustanza għall-ittestjar. Jekk jintuża filtru ta' fibra tal-ħġieġ, dan għandu jitnaddaf billi jinħema għal mill-anqas tliet siegħat f'400 °C.

20. Iż-żewġ solventi jkunu ssaturati reċiprokament qabel l-esperiment billi jkunu ekwilibrati f'reċipjent kbir biżżejjed. Dan isir billi s-sistema f'żewġ fażijiet titħawwad bil-mod għal jumejn.

21. Tintgħażel konċentrazzjoni adattata ta' sustanza għall-ittestjar u tinħall f'1-ottanol (saturat bl-ilma). Il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma jkun jeħtieġlu jiġi ddeterminat f'soluzzjonijiet dilwiti f'1-ottanol u ilma. Għalhekk il-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar m'għandhiex tkun aktar minn 70 % tas-solubilità tagħha b'konċentrazzjoni massima ta' 0,1 M f'wieħed miż-żewġ fażijiet (1). Is-soluzzjonijiet ta' 1-ottanol użati għall-esperiment għandhom ikunu mingħajr sustanza għall-ittestjar solida sospiża.

22. L-ammont adattat ta' sustanza għall-ittestjar jinħall f'1-ottanol (saturat bl-ilma). Jekk l-istima ta' log POW tkun aktar minn ħamsa, għandha tingħata attenzjoni biex is-soluzzjonijiet ta' 1-ottanol użati għall-esperiment ikunu mingħajr sustanza għall-ittestjar solida sospiża. Għal dak il-għan, qed tiġi segwita l-proċedura li ġejja għall-kimiċi b'valur stmat ta' log $P_{OW} > 5$:

— is-sustanza għall-ittestjar tinħall f'1-ottanol (saturat bl-ilma);

▼M4

— is-soluzzjoni tingħata ħin biżżejjed biex is-sustanza solida sospiża toqgħod. Waqt li s-sustanza tkun qed toqgħod, il-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar tiġi mmonitorjata;

— wara li l-konċentrazzjonijiet imkejla fis-soluzzjoni ta' 1-ottanol ikunu kisbu valuri stabbli, is-soluzzjoni stokk tiġi dilwita b'volum adattat ta' 1-ottanol;

— il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni stokk dilwita titkejjel. Jekk il-konċentrazzjoni mkejla tkun konsistenti mad-dilwizzjoni, is-soluzzjoni stokk dilwita tkun tista' tintuża fl-esperiment ta' tħawwid bil-mod.

Estrazzjoni u analiżi ta' kampjuni

23. Għandu jintuża metodu analitiku vvalidat għall-analiżi tas-sustanza għall-ittestjar. L-investigaturi għandhom jipprovdu xhieda li l-konċentrazzjonijiet f'1-ottanol saturat bl-ilma, kif ukoll fil-fażi tal-ilma saturat b'1-ottanol matul l-esperiment ikunu 'l fuq mil-limitu tal-metodu ta' kwantifikazzjoni tal-proċeduri analitiċi użati. L-irkupri analitiċi tas-sustanza għall-ittestjar mill-fażi tal-ilma u mill-fażi ta' 1-ottanol ikun jeħtiġilhom jiġu stabbiliti qabel l-esperiment f'dawk il-każijiet li għalihom ikunu meħtieġa metodi ta' estrazzjoni. Is-sinjal analitiku jkun jeħtieġlu jiġi kkoreġut għal in bjanki u għandha tingħata attenzjoni biex ma jseħħux riporti ta' analita minn kampjun għal ieħor.

24. L-estrazzjoni tal-fażi tal-ilma b'solvent organiku u konċentrazzjoni minn qabel tal-estratt aktarx li jkunu meħtieġa qabel l-analiżi, minħabba konċentrazzjonijiet pjuttost baxxi ta' sustanzi għall-ittestjar idrofobiċi fil-fażi tal-ilma. Għall-istess raġuni jkun meħtieġ li jitnaqqsu l-konċentrazzjonijiet in bjank eventwali. Għal dak il-għan, ikun meħtieġ li jintużaw solventi ta' purezza għolja, preferibbilment solventi għall-analiżi tar-residwi. Minbarra dan, li wieħed jaħdem b'oġġetti tal-ħġieġ maħsulin sew minn qabel (eż. ħasil b'solventi jew ħami f'temperatura għolja) jgħin biex tkun evitata l-kontaminazzjoni kroċjata.

25. Stima tal-log P_{OW} tista' tinkiseb minn programm ta' stima jew permezz ta' ġudizzju espert. Jekk il-valur ikun ogħla minn sitta, f'dak il-każ korrezzjonijiet in bjank u r-riporti analita jeħtieġu jkunu mmonitorjati mill-qrib. Bl-istess mod, jekk l-istima ta' log P_{OW} tkun aktar minn sitta, l-użu ta' standard sostitut għall-korrezzjoni ta' rkupru huwa obbligatorju, biex ikunu jistgħu jintlaħqu fatturi ta' konċentrazzjoni minn qabel. Huma kummerċjalment disponibbli għadd ta' programmi tas-softwer għall-istima tal-log P_{OW} ([1]), eż. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) u ACD log P (19). Id-deskrizzjonijiet tal-approċċi tal-stima jinsabu fir-referenzi (20-22).

26. Il-limiti ta' kwantifikazzjoni (LOQ) għad-determinazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol u l-ilma huma stabbiliti bl-użu ta' metodi aċċettati. Bħala regola bażika, il-limitu tal-metodu ta' kwantifikazzjoni jista' jkun iddeterminat bħala l-konċentrazzjoni fl-ilma jew f'1-ottanol li tipproduċi proporzjon ta' sinjal għal ħoss ta' għaxra. Għandu jintgħażel metodu adattat ta' estrazzjoni u konċentrazzjoni minn qabel u l-irkupri analitiċi għandhom jiġu speċifikati wkoll. Jintgħażel fattur adattat ta' konċentrazzjoni minn qabel biex jinkiseb sinjal tad-daqs meħtieġ malli jkun hemm determinazzjoni analitika.

([1]) Din l-informazzjoni tingħata biss għall-konvenjenza ta' min jużahom. Programmi oħra ekwivalenti tal-kompjuter jistgħu jintużaw jekk ikun jista' jintwera li jipproduċu l-istess riżultati.

▼M4

27. Abbażi tal-parametri tal-metodu analitiku u tal-konċentrazzjonijiet mistennija, jiġi ddeterminat daqs approssimattiv tal-kampjun meħtieġ għad-determinazzjoni korretta tal-konċentrazzjoni kompost. Għandu jkun evitat l-użu ta' kampjuni tal-ilma li jkunu wisq żgħar biex jinkiseb sinjal analitiku suffiċjenti. Għandu jkun evitat ukoll l-użu ta' kampjuni tal-ilma li jkunu eċċessivament kbar, għax inkella jista' jkun li jifdal ftit wisq ilma għal għadd minimu ta' analiżi meħtieġa (n = 5). Fl-Appendiċi 1, il-volum minimu tal-kampjuni huwa indikat bħala funzjoni tal-volum tar-reċipjent, l-LOD tas-sustanza għall-ittestjar u s-solubilità tas-sustanza għall-ittestjar.

28. Il-kwantifikazzjoni tas-sustanzi għall-ittestjar isseħħ b'paragun mal-kurvi ta' kalibrazzjoni tal-kompost rispettiv. Il-konċentrazzjonijiet fil-kampjuni analizzati għandhom ikunu kkategorizzati skont il-konċentrazzjonijiet tal-istandards.

29. Għal sustanzi għall-ittestjar bi stima tal-log P_{OW} ogħla minn sitta, għandu jitħallat standard sostitut mal-ilma qabel l-estrazzjoni sabiex ikun irreġistrat it-telf li jseħħ matul l-estrazzjoni u l-konċentrazzjoni minn qabel tal-kampjuni tal-ilma. Għal korrezzjoni korretta tal-irkupri, is-sostituti għandu jkollhom proprjetajiet li jkunu qrib ħafna ta', jew identiċi għal dawk tas-sustanza għall-ittestjar. Preferibbilment, għal dan il-għan jintużaw analogi b'tikketti isotopiċi (stabbli) tas-sustanzi ta' interess (pereżempju, perdewterat jew b'tikketti ^{13}C). Jekk l-użu ta' isotopi stabbli b'tikketta, jiġifieri ^{13}C jew ^{2}H, ma jkunx possibbli, għandu jintwera minn dejta affidabbli fil-letteratura li l-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sostitut huma qrib ħafna ta' dawk tas-sustanza għall-ittestjar. Matul l-estrazzjoni ta' likwidu-likwidu tal-fażi tal-ilma jistgħu jifformaw l-emulsjonijiet. Dawn jistgħu jitnaqqsu billi jiżdied il-melħ u l-emulsjoni titħalla toqgħod matul il-lejl. Il-metodi użati għall-estrazzjoni u għall-konċentrazzjoni minn qabel tal-kampjuni jeħtiġilhom ikunu rrappurtati.

30. Il-kampjuni meħudin mill-fażi ta' 1-ottanol jistgħu, jekk ikun meħtieġ, jiġu dilwiti b'solvent adattat qabel l-analiżi. Minbarra dan, huwa rrakkomandat l-użu ta' standards sostituti għal korrezzjoni ta' rkupri għal sustanzi li għalihom l-esperimenti ta' rkupru jkunu wrew grad għoli ta' varjazzjoni fl-esperimenti ta' rkupru (devjazzjoni standard relattiva > 10 %).

31. Id-dettalji tal-metodu analitiku jeħtiġilhom ikunu rrappurtati. Dan jinkludi l-metodu tal-estrazzjoni, il-konċentrazzjoni minn qabel u fatturi ta' dilwizzjoni, parametri ta' strumenti, rutina ta' kalibrazzjoni, firxa ta' kalibrazzjoni, irkupru analitiku tas-sustanza għall-ittestjar mill-ilma, żieda ta' standards sostituti għal korrezzjoni ta' rkupri, valuri in bjank, limiti ta' detezzjoni u limiti ta' kwantifikazzjoni.

Prestazzjoni tat-Test

Proporzjonijiet ottimi tal-volum ta' 1-ottanol/ilma

32. Fl-għażla tal-volumi ta' ilma u 1-ottanol, għandhom jitqiesu l-LOQ f'1-ottanol u l-ilma, il-fatturi ta' konċentrazzjoni minn qabel applikati lill-kampjuni tal-ilma, il-volumi li tagħhom ikunu ttieħdu l-kampjuni f'1-ottanol u l-ilma, u l-konċentrazzjonijiet mistennija. Għal raġunijiet ta' sperimentazzjoni, il-volum ta' 1-ottanol fis-sistema ta' tħawwid bil-mod għandha tintgħażel b'mod li s-saff ta' 1-ottanol ikun oħxon biżżejjed (> 0,5 cm) sabiex jippermetti t-teħid ta' kampjuni tal-fażi ta' 1-ottanol mingħajr ma jiddisturbah.

33. Il-proporzjonijiet tipiċi tal-fażijiet għad-determinazzjonijiet ta' komposti b'log P_{OW} ta' 4,5 u ogħla huma 20 sa 50 ml ta' 1-ottanol u 950 sa 980 ml ta' ilma f'reċipjent ta' litru wieħed.

▼M4

Kundizzjonijiet tat-test

34. Matul it-test ir-reċipjent tar-reazzjoni għandu termostat biex inaqqas il-varjazzjoni tat-temperatura għal inqas minn 1 °C. L-analiżi għandha titwettaq f'25 °C.

35. Is-sistema sperimentali għandha tkun protetta mid-dawl naturali billi l-esperiment isir f'kamra mudlama jew billi r-reċipjent ta' reazzjoni jitgħatta b'folja tal-aluminju.

36. L-esperiment għandu jsir f'ambjent ħieles (kemm jista' jkun) mit-trab.

37. Is-sistema ta' 1-ottanol-ilma titħawwad sakemm jinkiseb ekwilibriju. F'esperiment pilota jkun ivvalutat it-tul tal-perjodu ta' ekwilibrazzjoni billi jsir esperiment ta' tħawwid bil-mod u perjodikament jittieħed kampjun tal-ilma u ta' 1-ottanol. Il-punti ta' ħin ta' teħid ta' kampjun għandhom jitqassmu f'perjodu minimu ta' ħames sigħat.

38. Kull determinazzjoni tal-P_{OW} għandha ssir billi jsiru mill-anqas tliet esperimenti indipendenti ta' tħawwid bil-mod.

Determinazzjoni tal-ħin ta' ekwilibrazzjoni

39. Huwa preżunt li l-ekwilibriju jinkiseb meta rigressjoni tal-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' 1-ottanol/ilma mal-ħin tul intervall ta' ħin ta' erba' punti ta' ħin trendi angolu li ma jkunx differenti b'mod sinifikanti minn żero f'livell p ta' 0,05. Il-ħin minimu ta' ekwilibrazzjoni huwa ta' jum qabel ma jinbeda jittieħed il-kampjun. Bħala regola, it-teħid ta' kampjuni ta' sustanzi bi stima ta' log P_{OW} ta' anqas minn ħamsa jista' jsir matul it-tieni u t-tielet jum. L-ekwilibrazzjoni jista' jkollha tkun estiża għal komposti aktar idrofobiċi. Għal kompost b'log P_{OW} ta' 8,23 (dekaklorobifenil) 144 siegħa kienu suffiċjenti għal ekwilibrazzjoni. L-ekwilibriju jiġi vvalutat permezz ta' teħid ripetut ta' kampjuni ta' reċipjent wieħed.

Bidu tal-esperiment

40. Fil-bidu tal-esperiment ir-reċipjent ta' reazzjoni jimtela bl0ilma saturat b'1-ottanol. Għandu jitħalla jkun hemm ħin biżżejjed biex tintlaħaq it-temperatura tat-termostat.

41. L-ammont mixtieq ta' sustanza għall-ittestjar (maħlula fil-volum meħtieġ ta' 1-ottanol saturat bl-ilma) tiżdied b'attenzjoni fir-reċipjent ta' reazzjoni. Dan huwa stadju kruċjali fl-esperiment, minħabba li għandu jkun evitat it-taħlit b'turbulenza taż-żewġ fażijiet. Għal dak il-għan, il-fażi ta' 1-ottanol tista' tgħaddi bil-mod minn pipetta mal-ħajt tar-reċipjent sperimentali, qrib il-wiċċ tal-ilma. Wara tgħaddi fi fluss tul il-ħajt tal-ħġieġ u tifforma rita 'l fuq mill-fażi tal-ilma. Id-dikantar ta' 1-ottanol direttament fil-flixkun għandu dejjem jiġi evitat; it-taqtiriet ta' 1-ottanol m'għandhomx jitħallew jaqgħu direttament fl-ilma.

42. Wara li jibda t-tħawwid, ir-rata ta' tħawwid għandha tiżdied bil-mod. Jekk il-muturi tat-tħawwid ma jkunux jistgħu jiġu aġġustati sewwa għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' trasformatur. Ir-rata ta' tħawwid għandha tiġi aġġustat sabiex tinħoloq il-vortiċi fil-interfaċċa bejn l-ilma u 1-ottanol ta' fond ta' 0,5 għal massimu ta' 2,5 cm. Ir-rata ta' tħawwid għandha titnaqqas jekk il-fond tal-vortiċi jaqbeż it-2,5 cm; inkella jistgħu jifformaw taqtiriet mikro mit-taqtiriet ta' 1-ottanol fil-fażi tal-ilma, li jwassal għal stima eċċessiva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fl-ilma. Hija rrakkomandata r-rata massima ta' tħawwid ta' 2,5 cm abbażi tas-sejbiet fl-istudju ta' validazzjoni tar-ring-test (5). Huwa kompromess bejn il-kisba ta' rata mgħaġġla ta' ekwilibrazzjoni, filwaqt li tkun illimitata l-formazzjoni ta' taqtiriet mikro ta' 1-ottanol.

▼M4

Teħid ta' Kampjuni u Trattament tal-Kampjuni

43. Il-ħawwad għandu jintefa qabel ma jittieħdu l-kampjuni u l-likwidi għandhom jitħallew jieqfu milli jiċċaqalqu. Wara li jitlesta t-teħid tal-kampjuni, il-ħawwad jerġa' jitqabbad bil-mod, kif deskritt hawn fuq, u mbagħad ir-rata ta' ħawwid tiżdied gradwalment.

44. Il-faża tal-ilma jitteħdilha kampjun minn rubinett tal-għeluq fil-qiegħ tar-reċipjent ta' reazzjoni. Skarta dejjem il-volum mejjet ta' ilma li jkun hemm fil-vitijiet (madwar 5 ml fir-reċipjent muri fl-Appendiċi 2). L-ilma fil-vitijiet ma jitħawwadx u, għalhekk, ma jkunx f'ekwilibriju mal-bulk. Innota l-volum tal-kampjuni tal-ilma, u żgura li jitqies l-ammont ta' sustanza għall-ittestjar li jkun hemm fl-ilma skartat meta tiffissa bilanċ tal-massa. It-telfiet minħabba l-evaporazzjoni għandhom ikunu mminimizzati billi l-ilma jitħalla jgħaddi fi fluss mingħajr taqlib fil-lembut separatorju, b'mod li ma jkunx hemm disturb tas-saff tal-ilma/1-ottanol.

45. Il-kampjuni ta' 1-ottanol jinkisbu billi tittieħed alikwota żgħira (madwar 100 µl) mis-saff ta' 1-ottanol b'siringa ta' 100 mikrolitru kollha kemm hija tal-ħġieġ u l-metall. Għandha tingħata attenzjoni li l-limitu ma jitqallibx. Il-volum tal-likwidu li jkun itteħiedlu kampjun jiġi rreġistrat. Alikwota żgħira hija biżżejjed, minħabba li l-kampjun ta' 1-ottanol se jiġi dilwit.

46. Stadji mhux meħtieġa ta' trasferiment ta' kampjuni għandhom ikunu evitati. Għal dak il-għan il-volum ta' kampjun għandu jkun iddeterminat b'mod gravimetriku. F'każ ta' kampjuni ta' ilma dan ikun jista' jinkiseb bil-ġbir tal-kampjun tal-ilma f'lembut separatorju li jkun diġà fih il-volum meħtieġ ta' solvent.

DEJTA U RAPPURTAR

47. Skont dan il-Metodu ta' Ttestjar, P_{OW} ikun iddeterminat billi jsiru tliet esperimenti ta' ħawwid bil-mod (tliet unitajiet sperimentali) bil-kompost li jkun qed jiġi investigat li juża kundizzjonijiet identiċi. Ir-rigressjoni użata biex jintwera li jkun inkiseb ekwilibriju għandha tkun ibbażata fuq ir-riżultati ta' mill-anqas erba' determinazzjonijiet ta' C_O/C_W f'punti konsekuttivi ta' ħin. Dan jippermetti li tkun ikkalkulata varjanza bħala kejl tal-inċertezza tal-valur medju miksub minn kull unità sperimentali.

48. Il-P_{OW} jista' jiġi kkaratterizzat mill-varjanza fid-dejta miksuba għal kull unità sperimentali. Din l-informazzjoni tintuża biex ikun ikkalkulat il-P_{OW} bħala l-medja peżata tar-riżultati tal-unitajiet sperimentali individwali. Biex isir dan, jintuża bħala piż l-invers tal-varjanza tar-riżultati tal-unitajiet sperimentali. Bħala riżultat, dejta b'varjazzjoni kbira (espressa bħala l-varjanza) u, għalhekk, b'anqas affidabbiltà, ikollha anqas influwenza fuq ir-riżultat minn dejta b'varjanza baxxa.

49. B'mod analoġiku, tiġi kkalkulata d-devjazzjoni standard peżata. Din tikkaratterizza r-ripetibbiltà tal-kejl tal-P_{OW}. Valur baxx tad-devjazzjoni standard peżata jindika li d-determinazzjoni tal-P_{OW} kienet ripetibbli ħafna f'laboratorju wieħed. It-trattament formali tal-istatistika tad-dejta jinsab spjegat hawn taħt.

▼M4

Trattament tar-riżultati

Wiri ta' kisba ta' ekwilibriju

50. Il-logaritmu tal-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol u ilma (log (C_O/C_w)) huwa kkalkulat għal kull ħin ta' teħid ta' kampjuni. Il-kisba ta' ekwilibriju kimiku tintwera billi dan il-proporzjon jitfassal f'konfront mal-ħin. Livell kostanti f'din il-grafika li jkun ibbażat f'mill-anqas fuq erba' punti konsekuttivi ta' ħin jindika li jkun inkiseb ekwilibriju, u li l-kompost ikun inħall tassew f'1-ottanol. Jekk le, it-test ikun jeħtieġlu jitkompla sakemm erba' punti suċċessivi ta' ħin jrendu angolu li ma jkunx differenti b'mod sinifikanti minn 0 f'livell p ta' 0,05, li jindika li log C_O/C_w huwa indipendenti mill-ħin.

Kalkolu ta' Log P_{OW}

51. Il-valur ta' log P_{OW} tal-unità sperimentali huwa kkalkulat bħala l-valur medju peżat ta' log C_o/C_w għall-parti tal-kurva ta' log C_o/C_w vs il-ħin, li għalih ikun intwera l-ekwilibriju. Il-medja peżata hija kkalkulata billi d-dejta tintiżen mal-invers tal-varjanza sabiex l-influwenza tad-dejta fuq ir-riżultat finali tkun proporzjonata b'mod invers għall-inċertezza fid-dejta.

Medja ta' log P_{OW}

52. Il-valur medju ta' log P_{OW} ta' unitajiet sperimentali differenti huwa kkalkulat bħala l-medja tar-riżultati tal-unitajiet sperimentali individwali ppeżati mal-varjanzi rispettivi tagħhom.

Il-kalkulazzjoni ssir kif ġej:

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

fejn

$\log P_{OW,i}$ = il-valur log P_{OW} tal-unità sperimentali i individwali;

$\log P_{OW,Av}$ = il-valur medju peżat tad-determinazzjonijiet log P_{OW} individwali;

w_i = il-piż statistiku assenjat lil valur log P_{OW} tal-unità sperimentali i.

Ir-reċiproku tal-varjanza ta' log $P_{OW,i}$ jintuża bħala w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. L-iżball tal-medja ta' log P_{OW} huma stmat bħala r-ripetibbiltà ta' log C_o/C_w iddeterminat matul il-fażi ta' ekwilibriju fl-unitajiet sperimentali individwali. Huwa espress bħala d-devjazzjoni standard peżata ta' log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) li mbagħad ikun kejl tal-iżball assoċjat ma' log $P_{OW,Av}$. Id-devjazzjoni standard peżata tista' tiġi kkomputata mill-varjanza peżata $\text{var}_{\log Pow,Av}$ kif ġej:

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

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

Is-simbolu n huwa għall-għadd ta' unitajiet sperimentali.

▼M4

Rapport tat-test

54. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza għall-ittestjar:

— isem komuni, isem tal-kimika, numru tal-CAS, formula strutturali (li tindika l-pożizzjoni tat-tikketta meta tintuża sustanza b'tikketta radjoloġika) u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti (ara l-paragrafu 17);

— purezza (impuritajiet) tas-sustanza għall-ittestjar;

— purezza tat-tikketta ta' kimiċi b'tikketta u attività molari (fejn jixraq);

— stima preliminari ta' log P_{ow}, kif ukoll il-metodu użat biex joħroġ il-valur.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dati tat-twettiq tal-istudji;

— temperatura matul l-esperiment;

— volumi ta' 1-ottanol u ilma fil-bidu tat-test;

— volumi ta' kampjuni meħudin ta' 1-ottanol u ilma;

— volumi ta' 1-ottanol u ilma li jifdal fir-reċipjenti tat-test;

— deskrizzjoni tar-reċipjenti tat-test u tal-kundizzjonijiet tat-tħawwid (ġeometrija tal-virga tat-tħawwid u tar-reċipjent tat-test, l-għoli tal-vortiċi f'mm, u meta disponibbli: rata ta' tħawwid) użati;

— metodi analitiċi użati biex ikunu ddeterminati s-sustanza għall-ittestjar u l-limitu tal-metodu ta' kwantifikazzjoni;

— ħinijiet ta' teħid ta' kampjuni;

— il-pH tal-fażi fl-ilma u l-bafers użati, meta l-pH ikun aġġustat għal molekuli jonizzabbli;

— għadd ta' replikati.

Riżultati:

— ripetibbiltà u sensittività tal-metodi analitiċi użati;

— konċentrazzjonijiet iddeterminati tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol u ilma bħala funzjoni ta' ħin;

— wiri ta' bilanċ tal-massa;

— temperatura u devjazzjoni standard jew il-firxa tat-temperatura matul l-esperiment;

— ir-rigressjoni tal-proporzjon ta' konċentrazzjoni f'konfront mal-ħin;

— il-valur medju ta' log $P_{ow,Av}$ u l-iżball standard tiegħu;

— diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;

▼M4

— eżempji ta' ċifri ta' dejta mhux maħduma ta' analiżi rappreżentattiva (id-dejta kollha mhux maħduma għandha tinħażen skont standards tal-GLP), inklużi rkupri ta' sostituti, u l-għadd ta' livelli użati fil-kalibrazzjoni (flimkien mal-kriterji għall-koeffiċjent ta' korrelazzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni), u r-riżultati ta' garanzija tal-kwalità/kontroll tal-kwalità (QA/QC);

— meta disponibbli: rapport ta' validazzjoni tal-proċedura ta' analiżi (li għandu jkun indikat fost ir-referenzi).

LETTERATURA:

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) Il-Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness, Koeffiċjent tal-Partizzjoni.

(3) Il-Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness, Koeffiċjent tal-Partizzjoni.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) Il-Kapitolu A.6 ta' dan l-Anness, Solubilità tal-Ilma.

(11) Il-Kapitolu C.7 ta' dan l-Anness, Degradazzjoni – Idroliżi ta' Degradazzjoni Abijotika bħala Funzjoni ta' pH.

(12) Il-Kapitolu C.4 - Parti II – VII (Metodu A sa F) ta' dan l-Anness, Determinazzjoni ta' Bijodegradabilità "Faċli".

(13) Il-Kapitolu A.4 ta' dan l-Anness, Pressjoni tal-Fwar.

(14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Kanada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Appendiċi 1

Spreadsheet għall-komputazzjoni ta' volumi minimi ta' ilma meħtieġ għall-detezzjoni ta' sustanzi għall-ittestjar ta' valuri differenti ta' log P_{OW} fil-fażi fl-ilma

Suppożizzjonijiet:

— Volum massimu ta' alikwoti individwali = 10 % tal-volum totali; 5 alikwoti = 50 % tal-volum totali.

— Koncentrazzjoni ta' sustanzi ghall-ittestjar = 0,7 × solubilità f'fazi wahda jew ohra. F'każ ta' konċentrazzjonijiet aktar baxxi, ikunu meħtieġa volumi akbar.

— Volum użat għal determinazzjoni ta' LOD = 100 ml.

— log P_{ow} vs. log S_w u log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) huma rappreżentazzjonijiet raġonevoli ta'relazzjonijiet għal sustanzi għall-ittestjar.

Stima ta' S_w

log P_{ow}	ekwazzjoni	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 3,192	6,427E-04

Stima ta' S_{oct}

log P_{ow}	ekwazzjoni	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼**M4**

Total tal-Massa tas-sustanza għall-ittestjar (mg)	$Massa_{oct}/Massa_{ilma}$	$Massa_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Massa_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Komputazzjoni ta' volumi

Volum minimu meħtieġ għal fażi ta' H_2O f'kull konċentrazzjoni ta' LOD

$\log K_{ow}$	LOD (mikrogrammi/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volum użat għal LOD (l)	0,1					

Spjegazzjoni tal-Komputazzjonijiet

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' fażi fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 1 litru.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' fażi fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 2 litri.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' fażi fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 5 litri.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' fażi fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 10 litri.

Jeċċedi l-10 % ta' reċipjent ta' ekwilibrazzjoni anke tal-10 litri.

▼M4

Prospett ta' volumi meħtieġa, bħala funzjoni ta' solubilità fl-ilma u Log P_{ow}

Volum minimu meħtieġ għal faži ta' H_2O f'kull konċentrazzjoni ta' LOD (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

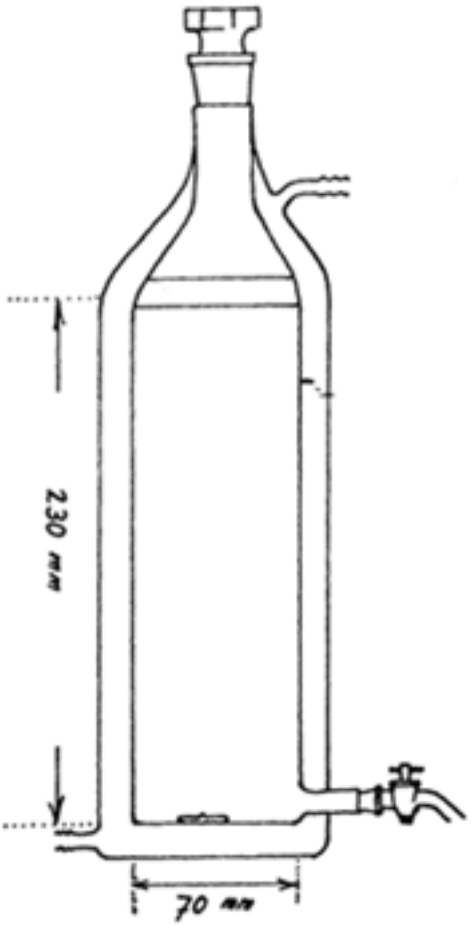
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volum użat għal LOD (l)		0,1					

▼M4

Appendiċi 2

Eżempju ta' reċipjent tat-test imdawwar bil-ħġieġ għall-esperiment ta' tħawwid bil-mod għal determinazzjoni ta' P_{OW}



▼M6

A.24. **KOEFFIĊJENT TA' PARTIZZJONI (N-OTTANOL/ILMA), METODU TA' KROMATOGRAFIJA LIKWIDA BI PRESTAZZJONI GĦOLJA (HPLC)**

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar tal-OECD (TG) 117 (2004)

1. Il-koeffiċjent ta' partizzjoni (P) huwa ddefinit bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjonijiet tal-ekwilibriju ta' sustanza maħlula f'sistema b'żewġ fażijiet li tikkonsisti f'żewġ solventi li fil-parti l-kbira ma jistgħux jitħalltu. Fil-każ ta' n-ottanol u ilma,

$$P_{ow} = \frac{C_n - octanol}{C_{water}}$$

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni li huwa l-kwozjent ta' żewġ konċentrazzjonijiet, huwa mingħajr dimensjoni u normalment jingħata fil-forma tal-logaritma tiegħu għal bażi ta' għaxra.

2. P_{ow} huwa paremetru ewlieni fl-istudji tad-destin ambjentali tas-sustanzi kimiċi. Intweriet relazzjoni sinifikanti ħafna bejn il-P_{ow} ta' forma mhux jonizzata ta' sustanzi u l-bijoakkumulazzjoni tagħhom fil-ħut. Intwera wkoll li P_{ow} huwa parametru utli fit-tbassir tal-adsorbiment fil-ħamrija u n-naqal u għall-istabbiliment ta' relazzjonijiet bejn l-istruttura u l-attività kwantitattivi għal firxa wiesgħa ta' effetti bijoloġiċi.

3. Il-proposta oriġinali għal dan il-metodu ta' ttestjar kienet ibbażata fuq artiklu minn C.V. Eadsforth u P. Moser (1). L-iżvilupp tal-metodu ta' ttestjar u test ta' tqabbil bejn il-laboratorji tal-OECD kienu kkoordinati mill-Umweltbundesamt tar-Repubblika Federali tal-Ġermanja matul l-1986 (2).

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

4. Valuri log P_{ow} fil-medda – 2 sa 4 (xi drabi sa 5 u iktar) ([1]) jistgħu jiġu determinati b'mod sperimentali bil-metodu Flask tat-Theżżiż (Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness, Linja Gwida tat-Test 107 tal-OECD). Il-metodu HPLC ikopri log P_{ow} fil-medda ta' 0 sa 6 (1)(2)(3)(4)(5). Dan il-metodu jaf ikun jeħtieġ stima tal-P_{ow} biex jassenja s-sustanzi ta' referenza xierqa u jappoġġja kwalunkwe konklużjoni maħruġa mid-dejta ġġenerata mit-test. Il-metodi ta' kalkolu huma diskussi fil-qosor fl-Appendiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Il-modalità ta' operazzjoni HPLC hija isokratika.

5. Il-valuri tal-P_{ow} jiddependu mill-kundizzjonijiet ambjentali bħat-temperatura, il-pH, is-saħħa jonika eċċ, u dawn għandhom jiġu ddefiniti fl-esperiment għall-interpretazzjoni korretta tad-dejta dwar il-P_{ow}. Għal sustanzi jonizzabbli, metodu ieħor (eż. abbozz tal-linja gwida tal-OECD dwar il-metodu metriku tal-pH għal sustanzi jonizzati (6)) jista' jsir disponibbli u jista' jintuża bħala metodu alternattiv. Għalkemm dan l-abbozz tal-lingwa gwida tal-OECD jaf ikun xieraq biex jiġi ddeterminat il-P_{ow} għal dawn is-sustanzi jonizzabbli, f'xi każijiet huwa iktar xieraq li jintuża l-metodu HPLC f'pH ambjentalment rilevanti (ara l-paragrafu 9).

([1]) Jingħata limitu superjuri minħabba l-ħtieġa li tintlaħaq fażi ta' separazzjoni kompleta wara l-aġġustamenti tal-ekwilibriju tal-partizzjoni u qabel jittieħdu kampjuni għal analiżijiet kwantitattivi. Jekk tingħata attenzjoni xierqa, il-limitu superjuri jista' jiġi estiż għal valuri ogħla ta' P_{ow}

▼M6

PRINĊIPJU TAL-METODU

6. Titwettaq HPLC f'faża inversa fuq kolonni analitiċi ppakkjati b'faża solida kummerċjalment disponibbli li fihom ktajjen tal-idrokarburi twal (eż. C_8, C_{18}) magħqud kimikament mas-siliċju.

7. Sustanza kimika injettata f'tali partizzjonijiet tal-kolonna bejn il-faża tas-solvent mobbli u l-faża stazzjonarja tal-idrokarbouri hekk kif tiġi ttrasportata tul il-kolonna mill-faża mobbli. Is-sustanzi jinżammu fi proporzjon tal-koeffiċjent ta' partizzjoni idrokarbur/ilma tagħhom, b'sustanzi idrofiliċi elwiti l-ewwel u sustanzi lipofiliċi l-aħħar. Il-ħin ta' żamma huwa deskritt mill-fattur ta' kapaċità k ikkalkolat bl-espressjoni:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

fejn t_R huwa l-ħin ta' żamma tas-sustanza tat-test, u t_0 huwa l-ħin mejjet, jiġifieri l-ħin medju li molekula tas-solvent teħtieġ biex tgħaddi mill-kolonna. Mhumiex meħtieġa metodi analitiċi kwantitattivi u hija meħtieġa biss id-determinazzjoni tal-ħinijiet ta' żamma.

8. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ottanol/ilma ta' sustanza tat-test jista' jiġi kkalkolat billi jiġi ddeterminat b'mod sperimentali l-fattur tal-kapaċità k tiegħu fejn imbagħad jiddaħħal k fl-ekwazzjoni li ġejja:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

fejn

a, b = koeffiċjenti ta' rigressjoni lineari.

L-ekwazzjoni ta' hawn fuq tista' tinkiseb bir-rigressjoni lineari tal-log tal-koeffiċjenti ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanzi ta' referenza kontra l-log tal-fatturi ta' kapaċità tas-sustanzi ta' referenza.

9. Il-metodu HPLC f'faża inversa jippermetti li jiġu stmati l-koeffiċjenti ta' partizzjoni fil-medda tal-log P_{ow} bejn 0 u 6, iżda jista' jiġi estiż biex ikopri l-medda tal-log P_{ow} bejn 6 u 10 f'każijiet eċċezzjonali. Dan jaf ikun jeħtieġ li tiġi mmodifikata l-faża mobbli (3). Il-metodu mhuwiex applikabbli għal aċidi u bażijiet b'saħħithom, kumplessi tal-metalli, sustanzi li jkollhom reazzjoni mal-elwent, jew aġenti tensjoattivi. Il-miżuri jistgħu jitwettqu fuq sustanzi jonizzabbli fil-forma mhux jonizzata tagħhom (aċidu ħieles jew bażi ħielsa) biss permezz ta' bafer xieraq b'pH taħt il-pK_a għal aċidu ħieles jew iktar mill-pK_a għal bażi ħielsa. Inkella, il-metodu metriku tal-pH għall-ittestjar ta' sustanzi jonizzabbli (6) jista' jitqiegħed għad-dispożizzjoni u jista' jintuża bħala metodu alternattiv (6). Jekk il-valur tal-log P_{ow} jiġi ddeterminat għall-użu fi klassifikazzjoni tal-perikli tal-ambjent jew f'valutazzjoni tar-riskju ambjentali, it-test għandu jitwettaq fil-medda ta' pH rilevanti għall-ambjent naturali, jiġifieri fil-medda tal-pH ta' 5,0 - 9.

10. F'xi każijiet, l-impuritajiet jistgħu jagħmlu l-interpretazzjoni tar-riżultati diffiċli minħabba l-inċertezza fl-assenjazzjonijiet tal-ogħla livelli. Għal taħlitiet li jirriżultaw f'faxxa mhux riżolta, għandhom jiġu rrapportati l-limiti superjuri u inferjuri tal-log P_{ow}, u l- % taż-żona tal-ogħla livelli tal-log P_{ow} kollha. Għal taħlitiet li huma gruppi ta' omologi, għandu jiġi ddikjarat ukoll il-log P_{ow} medju ppeżat (7), ikkalkolat abbażi ta' valuri P_{ow} uniċi u l-valuri korrispondenti tal- % taż-żona (8). L-ogħla livelli kollha li jikkontribwixxu għal żona ta' 5 % jew iktar għaż-żona totali tal-ogħla livell għandhom jitqiesu fil-kalkolu (9):

▼**M6**

$$\textit{weighted average } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\textit{area \%})}{\textit{total peak area \%}} = \frac{\sum (\textit{log } P_{owi})(\textit{area \%}_i)}{\sum_i \textit{area \%}}$$

Il-log P_{ow} medju mwieżen huwa validu biss għal sustanzi jew taħlitiet (eż. żjut twal) li jikkonsistu f'omologi (eż. serje ta' alkani). It-taħlitiet jistgħu jitkejlu b'riżultati sinifikanti, sakemm ir-rilevatur analitiku użat ikollu l-istess sensittività għas-sustanzi kollha fit-taħlita u jistgħu jiġu riżolti b'mod adegwat.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

11. Il-kostant ta' dissoċjazzjoni, il-formula strutturali, u s-solubbiltà fil-fażi mobbli għandhom ikunu magħrufin qabel jintuża l-metodu. Barra minn hekk, informazzjoni dwar l-idroloġi tkun utli.

KRITERJI TAL-KWALITÀ

12. Sabiex tiżdied il-kunfidenza fil-kejl, għandhom isiru determinazzjonijiet doppji.

— Ripetibbiltà: Il-valur tal-log P_{ow} minn kejliet ripetuti li jittieħdu f'kundizzjonijiet identiċi u permezz tal-istess sett ta' sustanzi ta' referenza għandu jaqa' fi ħdan medda ta' ± 0,1 tal-unitajiet tal-log.

— Riproduċibbiltà: Jekk il-kejliet jiġu ripetuti b'sett ta' sustanzi ta' referenza differenti, ir-riżultati jaf' ivarjaw. Ġeneralment, il-koeffiċjent ta' korrelazzjoni R għar-relazzjoni bejn il-log k u l-log P_{ow} għal sett ta' sustanzi tat-test huwa ta' madwar 0,9, li jikkorrispondi għal koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tal-log P_{ow} ± 0,5 unitajiet tal-log.

13. It-test tal-tqabbil bejn il-laboratorji wera li bil-metodu HPLC, il-valuri tal-log P_{ow} jistgħu jinkisbu sa fi ħdan ± 0,5 unitajiet tal-valuri tal-Flask tat-Teżżiż (2). Paraguni oħra jistgħu jinstabu fid-dokumentazzjoni (4)(5)(10)(11)(12). Graffs ta' korrelazzjoni bbażati fuq sustanzi ta' referenza strutturalment relatati jagħtu l-iktar riżultati preċiżi (13).

SUSTANZI TA' REFERENZA

14. Sabiex il-fattur tal-kapaċità k imkejjel jiġi kkorrelat mal-P_{ow} tiegħu, irid jiġi stabbilit graff ta' kalibrazzjoni permezz ta' mill-anqas 6 punti (ara l-paragrafu 24). Huwa f'idejn l-utent li jagħżel is-sustanzi ta' referenza xierqa. Normalment is-sustanzi ta' referenza għandu jkollhom valuri tal-log P_{ow} li jinkludu l-log P_{ow} tas-sustanza tat-test, jiġifieri tal-inqas sustanza ta' referenza waħda għandu jkollha P_{ow} ogħla minn dak tas-sustanza tat-test, u oħra P_{ow} inqas minn dak tas-sustanza tat-test. L-estrapolazzjoni għandha tintuża biss f'każijiet eċċezzjonali. Idealment dawn is-sustanzi ta' referenza jkunu strutturalment relatati mas-sustanza tat-test. Il-valuri tal-log P_{ow} tas-sustanzi ta' referenza użati għall-kalibrazzjoni għandhom ikunu bbażati fuq dejta sperimentali affidabbli. Madankollu, għal sustanzi b'log P_{ow} għoli (ġeneralment iktar minn 4), jistgħu jintużaw il-valuri kkalkolati sakemm ma tkunx disponibbli dejta sperimentali affidabbli. Jekk jintużaw valuri estrapolati, għandu jiġi kkwotat valur ta' limitu.

15. Huma disponibbli listi estensivi ta' valuri tal-log P_{ow} għal ħafna gruppi ta' sustanzi kimiċi (14)(15). Jekk dejta dwar il-koeffiċjent ta' partizzjoni tas-sustanzi strutturalment relatati ma tkunx disponibbli, tista' tintuża kalibrazzjoni iktar ġenerali, stabbilita b'sustanzi ta' referenza oħra. Sustanzi ta' referenza rakkomandati u l-valuri P_{ow} tagħhom huma elenkati fit-Tabella 1. Għal sustanzi jonizzabbli, il-valuri mogħtija japplikaw għall-forma mhux jonizzata. Il-valuri kienu ċċekkjati għall-plawżibbiltà u l-kwalità matul it-test ta' tqabbil bejn il-laboratorji.

▼**M6**

Tabella 1

Sustanzi ta' referenza rakkomandati

	Numru CAS	Sustanza ta' referenza	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-Butanon (Metiletilketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-Aċetilpiridina	0,5	
3	62-53-3	Anilinea	0,9	
4	103-84-4	Aċetanilid	1,0	
5	100-51-6	Alkoħol benżiliku	1,1	
6	150-76-5	4-Metossifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Aċidu fenossiaċetiku	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benżonitril	1,6	
11	140-29-4	Fenilaċetonitril	1,6	
12	589-18-4	Alkoħol 4-metilbenzil	1,6	
13	98-86-2	Aċetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	Aċidu 3-nitrobenżojku	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Kloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenżen	1,9	
18	104-54-1	Alkoħol taċ-ċinnamil (Alkoħol ċinnamiku)	1,9	
19	65-85-0	Aċidu benżojku	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-Kreżol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Aċidu ċinnamiku	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Aniżol	2,1	
23	93-58-3	Metilbenżoat	2,1	
24	71-43-2	Benżen	2,1	
25	99-04-7	Aċidu 3-metilbenżojku	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trikloroetilen	2,4	
28	1912-24-9	Atražina	2,6	
29	93-89-0	Benżoat tal-etil	2,6	

▼**M6**

	Numru CAS	Sustanza ta' referenza	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-Diklorobenżonitril	2,6	
31	535-80-8	Aċidu 3-klorobenżojku	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluwen	2,7	
33	90-15-3	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dikloroanilina	2,8	
35	108-90-7	Klorobenżen	2,8	
36	1746-13-0	Eter tal-fenil tal-allil	2,9	
37	108-86-1	Bromobenżen	3,0	
38	100-41-4	Etilbenżen	3,2	
39	119-61-9	Benżofenon	3,2	
40	92-69-3	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-Diklorobenżen	3,4	
43	122-39-4	Difenilamina	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalen	3,6	
45	93-99-2	Fenilbenżoat	3,6	
46	98-82-8	Isopropilbenżen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenil	4,0	
49	120-51-4	Benżilbenżoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sek-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Triklorobenżen	4,2	
52	143-07-7	Aċidu dodekanojku	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Etere tad-difenil	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-Butilbenżen	4,6	
56	103-29-7	Dibenżil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Difenilpiridina	4,9	
58	206-44-0	Fluworanten	5,1	
59	603-34-9	Trifenilamina	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Stima preliminari tal-koeffiċjenti ta' partizzjoni

16. Jekk ikun hemm bżonn, il-koeffiċjent ta' partizzjoni tas-sustanza tat-test jista' jiġi stmat idealment permezz ta' metodu ta' kalkolu (ara l-Appendiċi, jew fejn ikun xieraq, permezz tal-proporzjon tas-solubbiltà tas-sustanza tat-test fis-solventi puri.

Apparat

17. Huwa meħtieġ kromatografu b'faži likwida mgħammar b'pompa b'ritmu baxx u sistema ta' detezzjoni xierqa. Huwa applikabbli rilevatur tal-UV, li juża tul ta' mewġa ta' 210 nm, jew rilevatur tal-RI għal varjetà wiesgħa ta' gruppi ta' sustanzi kimiċi. Il-preżenza ta' gruppi polari fil-faži stazzjonarja tista' serjament ixxekkel il-prestazzjoni tal-kolonna HPLC. Għalhekk, il-fażijiet stazzjonarji għandu jkollhom perċentwal minimu ta' gruppi polari (16). Jista' jintuża ppakkjar f'faži inversa tal-mikropartikulati kummerċjali jew kolonni ppakkjati bil-lest. Tista' titqiegħed kolonna ta' lqugħ bejn is-sistema ta' injezzjoni u l-kolonna analitika.

Faži mobbli

18. Jintużaw metanol tal-grad HPLC u ilma dejonizzat jew distillat biex jitħejja s-solvent ta' elużjoni, li jitneħħielu l-gass qabel jintuża. Għandha tintuża elużjoni isokratika. Għandhom jintużaw proporzjonijiet ta' metanol/ilma b'kontenut minimu ta' ilma ta' 25 %. Ġeneralment taħlita ta' 3:1 (v/v) metanol/ilma hija sodisfaċenti għall-elużjoni ta' sustanzi b'log P ta' 6 fi żmien siegħa, b'rata ta' fluss ta' 1 ml/min. Għal sustanzi b'log P ikbar minn 6, jaf ikun hemm bżonn li jitqassar il-ħin ta' elużjoni (u dawk tas-sustanzi ta' referenza) billi titnaqqas il-polarità tal-faži mobbli jew it-tul tal-kolonna.

19. Is-sustanza tat-test u s-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu solubbli fil-faži mobbli f'konċentrazzjoni suffiċjenti li tippermetti d-detezzjoni tagħhom. Jistgħu jintużaw addittivi mat-taħlita ta' metanol/ilma f'każijiet eċċezzjonali biss, peress li dawn jibdlu l-proprjetajiet tal-kolonna. F'dawn il-każijiet, għandu jiġi kkonfermat li l-ħin ta' żamma tas-sustanzi tat-test u ta' referenza mhumiex influwenzati. Jekk it-taħlita ta' metanol/ilma ma tkunx xierqa, jistgħu jintużaw taħlitiet ta' solvent/ilma organiċi oħrajn, eż. etanol/ilma, aċetonitril/ilma jew isopropil alkoħol (2-propanol)/ilma.

20. Il-pH tal-elwent huwa essenzjali għal sustanzi jonizzabbli. Għandu jkun fi ħdan il-medda pH operattiva tal-kolonna, ġeneralment bejn 2 u 8. Huwa rakkomandat ibbaferjar. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati preċipitazzjoni tal-melħ u tgħarriq tal-kolonna li jseħħu b'xi taħlitiet tal-faži/bafer organiċi. Il-kejliet tal-HPLC b'fażijiet stazzjonari bbażati fuq is-siliċju b'pH ogħla minn 8 normalment mhumiex rakkomandati peress li l-użu ta' faži mobbli alkalina tista' tikkawża tgħarriq fil-prestazzjoni tal-kolonna.

Soluti

21. Is-sustanzi tat-test u ta' referenza għandhom ikunu kemm jista' jkun puri biżżejjed sabiex jiġu assenjati l-ogħla livelli fil-kromatogrammi għas-sustanzi rispettivi. Is-sustanzi li għandhom jintużaw għall-finijiet tal-ittestjar jew il-kalibrazzjoni jinħallu fil-faži mobbli jekk ikun possibbli. Jekk solvent minbarra l-faži mobbli jintuża biex iħoll is-sustanzi tat-test u ta' referenza, il-faži mobbli għandha tintuza għad-dilwizzjoni finali qabel l-injezzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test

22. It-temperatura matul il-kejl ma għandhiex tvarja b'aktar minn ± 1 °C.

▼M6

Determinazzjoni tal-ħin mejjet t_o

23. Il-ħin mejjet t_0 jista' jitkejjel permezz ta' sustanzi organiċi mhux miżmuma (eż. tjourea jew formamid). Jista' jiġi derivat ħin mejjet iktar preċiż mill-ħinijiet ta' żamma mkejla jew sett ta' madwar seba' membri ta' serje omologa (eż. n-alkil metil ketoni) (17). Il-ħinijiet ta' żamma t_R (n_C + 1) jiġu pplottjati mat-t_R (n_C), fejn n_C huwa n-numru ta' atomi tal-karbonju. Tinkiseb linja dritta, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, meta A, li tirrappreżenta $k(n_C + 1)/k(n_C)$, tkun kostanti. Il-ħin mejjet t_0 jinkiseb mill-interċett (1 – A)t_0 u l-gradjent A.

Ekwazzjoni ta' Rigressjoni

24. Il-pass li jmiss huwa li tiġi pplottjata korrelazzjoni ta' log k ma' log P għal sustanzi ta' referenza xierqa b'valuri log P qrib il-valur mistenni għas-sustanza tat-test. Fil-prattika, jiġu injettati minn 6 sa 10 sustanzi ta' referenza fl-istess ħin. Il-perjodi ta' żamma huma ddeterminati, preferibbilment fuq integratur ta' reġistrazzjoni marbut mas-sistema ta' detezzjoni. Il-logaritmi korrispondenti tal-fatturi ta' kapaċità, log k, huma pplottjati bħala funzjoni ta' log P. L-ekwazzjoni ta' rigressjoni titwettaq f'intervalli regolari, tal-inqas darba kuljum, sabiex jittieħed kont tal-bidliet possibbli fil-prestazzjoni tal-kolonna.

DETERMINAZZJONI TAL-P_{OW} TAS-SUSTANZA TAT-TEST

25. Is-sustanza tat-test tiġi injettata fl-iżgħar kwantitajiet traċċabbli. Il-ħin ta' żamma huwa ddeterminat darbtejn. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni tas-sustanza tat-test, jinkiseb bl-interpolazzjoni tal-fattur tal-kapaċità kkalkolat fuq il-graff tal-kalibrazzjoni. Għal koeffiċjenti ta' partizzjoni baxxi ħafna u għolja ħafna, hija meħtieġa estrapolazzjoni. Speċjalment f'dawn il-każijiet, għandha tingħata attenzjoni lil-limiti ta' kunfidenza tal-linja ta' rigressjoni. Jekk il-ħin ta' żamma tal-kampjun ma jaqax taħt il-medda tal-ħinijiet ta' żamma miksuba għall-istandards, għandu jiġi kkwotat valur ta' limitu.

DEJTA U RAPPORTAR

Rapport tat-test

26. Dan li ġej għandu jiġi inkluż fir-rapport:

— jekk tkun iddeterminata, l-istima preliminari tal-koeffiċjent tal-partizzjoni, il-valuri stmati u l-metodu użat; u jekk intuża metodu ta' kalkolu, id-deskrizzjoni sħiħa tiegħu inkluż l-identifikazzjoni tal-bażi ta' dejta u informazzjoni ddettaljata dwar l-għażla tal-frammenti;

— is-sustanzi tat-test ta' referenza: il-purità, il-formula strutturali u n-numru CAS,

— deskrizzjoni tat-tagħmir u l-kundizzjonijiet operattivi: il-kolonna analitika, il-kolonna ta' lqugħ,

— il-fażi mobbli, il-mezzi ta' detezzjoni, il-medda tat-temperatura, il-pH;

— il-profili ta' elużjoni (kromatogrammi);

— il-ħin mejjet u kif tkejjel;

— id-dejta u d-dokumentazzjoni dwar iż-żamma tal-valuri tal-log P_{ow} għal sustanzi ta' referenza użati fil-kalibrazzjoni;

— dettalji dwar linja ta' rigressjoni mdaħħla (log k meta mqabbel ma' log P_{ow}) u l-koeffiċjent ta' korrelazzjoni tal-linja inklużi l-intervalli ta' kunfidenza;

▼**M6**

— dejta ta' żamma medja u valur tal-log P_{ow} interpolat għas-sustanza tat-test;

— fil-każ ta' taħlita: il-kromatogramma tal-profil ta' elużjoni bil-valuri ta' limitu indikati;

— il-valuri tal-log P_{ow} relattivi għall- % taż-żona tal-ogħla livell ta' P_{ow};

— kalkolu permezz ta' linja ta' rigressjoni;

— valuri tal-log P_{ow} medji ppeżati kkalkolati, fejn ikun xieraq.

LETTERATURA

(1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.

(7) OSPAR (1995). "Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995", Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

(9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

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

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Appendiċi

Metodi ta' kalkolu tal-P_{OW}

INTRODUZZJONI

1. Dan l-appendiċi jipprovdi introduzzjoni qasira għall-kalkolu tal-P_{ow}. Għal iktar informazzjoni, il-qarrej għandu jirreferi għall-kotba (1)(2).

2. Il-valuri kkalkolati tal-P_{ow} jintużaw għal:

— deċiżjoni dwar liema metodu sperimentali għandu jintuża: Metodu tal-Flask Mheżżeż għal log P_{ow} bejn – 2 u 4 u metodu HPLC għal log P_{ow} bejn 0 u 6;

— l-għażla tal-kundizzjonijiet li għandhom jintużaw fl-HPLC (sustanzi ta' referenza, proporzjon ta' metanol/ilma);

— il-verifika tal-plawżibbiltà tal-valuri miksuba permezz ta' metodi sperimentali;

— l-għoti ta' stima meta ma jkunux jistgħu applikati metodi sperimentali.

Prinċipju tal-metodi ta' kalkolu

3. Il-metodi ta' kalkolu ssuġġeriti hawnhekk huma bbażati fuq il-frammentazzjoni teoretika tal-molekula f'sottostrutturi xierqa għal liema huma magħrufin żidiet fil-log P_{ow} affidabbli. Il-log P_{ow} jinkiseb billi l-valuri tal-frammenti jiżdiedu mat-termini ta' korrezzjoni għall-interazzjonijiet intramolekulari. Huma disponibbli listi ta' kostanti frammentati u termini ta' korrezzjoni (1)(2)(3)(4)(5)(6). Xi wħud huma aġġornati regolarment (3).

Affidabbiltà tal-valuri kkalkolati

4. B'mod ġenerali, l-affidabbiltà tal-metodi ta' kalkolu tonqos hekk kif tiżdied il-kumplessità tas-sustanza studjata. Fil-każ ta' molekuli sempliċi b'piż molekulari baxx u b'grupp funzjonali wieħed jew tnejn, wieħed jista' jistenna devjazzjoni ta' 0,1 sa 0,3 unitajiet ta' log P_{ow} bejn ir-riżultati tal-metodi ta' frammentazzjoni differenti u l-valuri mkejla. Il-marġni ta' żball sejjer jiddependi fuq l-affidabbiltà tal-kostanti tal-frammenti użati, il-ħila li jingħarfu l-interazzjonijiet intramolekulari (eż. ir-rabtiet tal-idroġenu) u l-użu xieraq tat-termini ta' korrezzjoni. Fil-każ ta' sustanzi jonizzanti, iċ-ċarġ u l-grad ta' jonizzazzjoni għandhom jittieħdu inkunsiderazzjoni (10).

Metodu Fujita-Hansch π

5. Il-kostant tas-sostitwent idrofobiku, π, introdott oriġinarjament minn Fujita et al. (7) huwa ddefinit bħala:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

fejn PhX huwa derivattiv aromatiku u PhH huwa s-sustanza ewlenija.

eż. $^{\pi}Cl = \log Pow\ (C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\ (C_6H_6)$
$= 2{,}84 - 2{,}13$
$\geq 0{,}71$

Il-π-metodu huwa primarjament ta' interess għal sustanzi aromatiċi. Huma disponibbli valuri-π għal numru kbir ta' sostitwenti (4)(5).

Metodu Rekker

6. Permezz tal-metodu Rekker (8) il-valur tal-P_{ow} huwa kkalkolat bħala:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interaction terms})$$

▼M6

fejn a_i huwa n-numru ta' drabi li jseħħ framment partikolari fil-molekula u f_i huwa ż-żieda fil-P_{ow} tal-framment. It-termini ta' interazzjoni jistgħu jiġu espressi bħala multiplu integrali ta' kostanti wieħed C_m (l-hekk imsejjaħ "kostanti magiku"). Il-kostanti tal-framment f_i u C_m ġew iddeterminati minn lista ta' 1 054 valur P_{ow} sperimentali ta' 825 sustanza permezz ta' analiżi tar-rigressjoni tal-multipli (6)(8). Id-determinazzjoni tat-termini ta' interazzjoni ssir skont regoli stabbiliti (6)(8)(9).

Metodu Hansch-Leo

7. Permezz tal-metodu Hansh u Leo (4), il-valur tal-log P_{ow} huwa kkalkolat bħala:

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

fejn f_i huwa kostant tal-framment, F_j terminu ta' korrezzjoni (fattur), a_i u b_j il-frekwenza korrispondenti tal-okkorrenza. Lista ta' valuri frammentali atomiċi u tal-grupp tat-termini ta' korrezzjoni F_j kienet idderivata b'approssimazzjoni minn valuri P_{ow} sperimentali. It-termini tal-korrezzjoni tqassmu f'diversi klassijiet differenti (1)(4). Il-pakketti tas-softwer ġew żviluppati biex iqisu r-regoli u t-termini ta' korrezzjoni kollha (3).

METODU KKOMBINAT

8. Il-kalkolu tal-log P_{ow} ta' molekuli kumplessi jista' jittejjeb b'mod konsiderevoli, jekk il-molekula tinqasam f'sottostrutturi ikbar għal liema jkunu disponibbli valuri log P_{ow} affidabbli mit-tabelli (3)(4) jew minn miżuri eżistenti. Imbagħad, it-tali frammenti (eż. eteroċikli, antrakinon,ażobenżen) jistgħu jiġu kkombinati mal-valuri Hansch π jew mal-kostanti tal-frammenti ta' Rekker jew Leo.

Rimarki

i) Il-metodi ta' kalkolu huma applikabbli biss ma' sustanzi parzjalment jew kompletament jonizzati meta jitqiesu l-fatturi ta' korrezzjoni meħtieġa.

ii) Jekk wieħed jista' jassumi l-eżistenza ta' rabtiet tal-idroġenu intramolekulari, għandhom jiżdiedu t-termini ta' korrezzjoni korrispondenti (madwar + 0,6 sa + 1,0 unitajiet ta' log P_{ow}) (1). Indikazzjonijiet dwar il-preżenza ta' tali rabtiet tista' tinkiseb minn mudelli tridimensjonali jew dejta spektroskopika.

iii) Jekk ikunu possibbli diversi forom tawtomeriċi, l-iktar forma probabbli għandha tintuża bħala l-bażi tal-kalkolu.

iv) Ir-reviżjonijiet tal-listi ta' kostanti frammentati għandhom jiġu segwiti b'attenzjoni.

LETTERATURA DWAR IL-METODI TA' KALKOLU

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

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

(4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. — *Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

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

(9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

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

▼M7

A.25. KOSTANTI TA' DISSOĊJAZZJONI FL-ILMA (METODU TA' WINKLER — METODU SPETTROFOTOMETRIKU — METODU KONDUTTOMETRIKU)

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 112 (1981) tal-OECD

Prerekwiżiti

— Metodu analitiku xieraq

— Is-solubilità fl-ilma

Informazzjoni ta' gwida

— Formula strutturali

— Il-konduttività elettrika għall-metodu konduttometriku

Dikjarazzjonijiet kwalifikati

— Il-metodi ta' ttestjar jistgħu jsiru fuq sustanzi puri jew ta' grad kummerċjali. Għandhom jiġu kkunsidrati l-effetti possibbli tal-impuritajiet fuq ir-riżultati.

— Il-metodu ta' Winkler mhuwiex adattat għal sustanzi b'solubilità baxxa (ara Soluzzjonijiet tat-test, iktar 'il quddiem).

— Il-metodu spettrofotometriku huwa applikabbli biss għal sustanzi li għandhom spettri tal-assorbiment tal-UV/VIS effettivament differenti għall-forom dissoċjati u mhux dissoċjati. Dan il-metodu jista' jkun adattat ukoll għal sustanzi b'solubilità baxxa u għal dissoċjazzjonijiet mhux aċidi/baži, eż. formazzjoni kumplessa.

— Fil-każijiet li fihom tapplika l-ekwazzjoni ta' Onsager, jista' jintuża l-metodu konduttometriku, anki f'konċentrazzjonijiet moderatament baxxi u anki f'każijiet għal ekwilibriji mhux aċidi/baži.

Dokumenti standard

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq metodi mogħtijin fir-referenzi elenkati fit-taqsima "Tagħrif" u fil-Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA tat-18 ta' Awwissu, 1978.

METODU — INTRODUZZJONI, SKOP, KAMP TA' APPLIKAZZJONI, RILEVANZA, APPLIKAZZJONI U LIMITI TAT-TEST

Id-dissoċjazzjoni ta' sustanza fl-ilma hija ta' importanza fil-valutazzjoni tal-impatt tagħha fuq l-ambjent. Tirregola l-forma tas-sustanza li min-naħa tagħha tistabbilixxi l-imġiba u t-trasport tagħha. Tista' taffettwa l-adsorbiment tas-sustanza kimika fuq il-ħamriji u s-sedimenti u l-assorbiment fiċ-ċelloli bijoloġiċi.

Definizzjonijiet u unitajiet

Id-dissoċjazzjoni hija l-qsim irriversibbli f'żewġ speċijiet kimiċi jew iktar li jistgħu jkunu joniċi. Ġeneralment il-proċess ikun indikat bi

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

u l-kostant ta' ekwilibriju tal-konċentrazzjoni li jirregola r-reazzjoni huwa

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Pereżempju, fil-każ partikolari li fih R huwa idroġenu (is-sustanza hija aċidu), il-kostant huwa

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

jew

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Sustanzi ta' referenza

Is-sustanzi ta' referenza li ġejjin mhux bilfors jintużaw fil-każijiet kollha meta tiġi investigata sustanza ġdida. Primarjament jiġu pprovduti sabiex kultant ikun jista' jiġi kkalibrat il-metodu u sabiex tingħata l-possibbiltà li jitqabblu r-riżultati meta jiġi applikat metodu ieħor.

	pK_a ([1])	Temp. f'°C
p-Nitrofenol	7.15	25 ([1])
Aċidu benżojku	4.12	20
p-Kloroanilina	3.93	20

([1]) Ma hemm l-ebda valur disponibbli għal 20 °C, iżda jista' jiġi supponut li l-varjabbiltà tar-riżultati tal-kejl hija ikbar mid-dipendenza tat-temperatura mistennija

Tajjeb li wieħed ikollu sustanza b'bosta pKs kif indikat fil-Prinċipju tal-metodu, hawn taħt. Sustana bħal din tista' tkun:

Aċidu ċitriku	pK_a (8)	Temp. f'°C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Il-prinċipju tal-metodu ta' ttestjar

Il-proċess kimiku deskritt ġeneralment fiit ikun dipendenti mit-temperatura fil-medda ta' temperaturi rilevanti għall-ambjent. Id-determinazzjoni tal-kostant ta' dissoċjazzjoni teħtieġ kejl tal-konċentrazzjonijiet tal-forom dissoċjati u mhux dissoċjati tas-sustanza kimika. Bl-għarfien tal-istekjometrija tar-reazzjoni ta' dissoċjazzjoni indikata fid-Definizzjonijiet u unitajiet, iktar 'il fuq, jista' jiġi stabbilit il-kostant it-tajjeb. Fil-każ partikolari deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, is-sustanza qiegħda ġġib ruħha bħala aċidu jew bażi, u d-determinazzjoni tista' ssir l-aħjar billi jiġu stabbiliti l-konċentrazzjonijiet rilevanti tal-forom jonizzati u mhux jonizzati tas-sustanza u l-pH tas-soluzzjoni. Ir-relazzjoni bejn dawn it-termini tingħata fl-ekwazzjoni għall-pK_a f'Definizzjonijiet u unitajiet, iktar 'il fuq. Ċerti sustanzi jesibixxu iktar minn kostant ta' dissoċjazzjoni wieħed u jistgħu jiġu żviluppati ekwazzjonijiet simili. Uħud mill-metodi deskritti hawnhekk huma adattati wkoll għal dissoċjazzjoni mhux aċida/bażi.

Kriterji tal-kwalità

Ripetibbiltà

Il-kostant ta' dissoċjazzjoni għandu jiġi rreplikat (tal-inqas tliet determinazzjonijiet) għal unità fi ħdan ± 0.1 unità log.

DESKRIZZJONI TAL-PROĊEDURI TA' TEST

Hemm żewġ approċċi bażiċi għad-determinazzjoni tal-pK_a. Wieħed jinvolvi titrazzjoni ta' ammont magħruf ta' sustanza b'aċidu jew bażi standard, kif xieraq; l-ieħor jinvolvi l-istabbiliment tal-konċentrazzjoni relattiva tal-forom jonizzati u mhux jonizzati u d-dipendenza tagħha mill-pH.

▼M7

Preparamenti

Il-metodi bbażati fuq dawk il-prinċipji jistgħu jiġu kklassifikati bħala proċeduri ta' titrazzjoni, ta' spettrofotometrija u ta' konduttometrija.

Soluzzjonijiet tat-test

Għall-metodu ta' Winkler u l-metodu konduttometriku, is-sustanza kimika għandha tiġi dissolta f'ilma distillat. Għal metodi spettrofotometriċi u oħrajn, jintużaw soluzzjonijiet mewwieta. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ma għandhiex taqbeż l-inqas wieħed bejn 0.01 M jew nofs il-konċentrazzjoni tas-saturazzjoni, u l-iktar forma pura disponibbli tas-sustanza għandha tintuża fit-tiswir tas-soluzzjonijiet. Jekk is-sustanza jkollha solubilità medja, tista' tiġi dissolta f'ammont żgħir ta' solvent li jitħallat mal-ilma qabel ma jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet indikati hawn fuq.

Is-soluzzjonijiet għandhom jiġu vverifikati għall-preżenza ta' emulsjonijiet bl-użu ta' raġġ ta' Tyndall, speċjalment jekk jintuża kosolvent sabiex tissaħħaħ is-solubilità. Meta jintużaw soluzzjonijiet mewwieta, il-konċentrazzjoni tal-bafer ma għandhiex taqbeż iż-0.05 M.

Kundizzjonijiet tat-test

Temperatura

It-temperatura għandha tiġi kkontrollata sa tal-inqas ± 1 °C. Id-determinazzjoni idealment għandha ssir f'20 °C.

Jekk ikun hemm suspett ta' dipendenza sinifikanti fuq it-temperatura, id-determinazzjoni għandha ssir f'tal-inqas żewġ temperaturi oħrajn. L-intervalli tat-temperatura għandhom ikunu ta' 10 °C f'dan il-każ u l-kontroll tat-temperatura ± 0.1 °C.

Analiżijiet

Il-metodu sejjer jiġi stabbilit mill-għamla tas-sustanza li tkun qiegħda tiġi ttest-jata. Irid ikun sensittiv biżżejjed sabiex ikunu jistgħu jiġu stabbiliti l-ispeċijiet differenti f'kull konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tat-test.

It-twettiq tat-test

Il-metodu ta' Winkler

Is-soluzzjoni tat-test tiġi stabbilita b'titrazzjoni bis-soluzzjoni bażi jew aċida standard kif xieraq, billi titkejjel il-pH wara kull żieda ta' soluzzjoni titrata. Għandhom isiru minimu ta' 10 żidiet addizzjonali qabel il-punt ta' ekwivalenza. Jekk l-ekwilibriju jintlaħaq malajr biżżejjed, jista' jintuża potentjometru tar-reġistrazzjoni. Għal dan il-metodu, kemm il-kwantità totali tas-sustanza kif ukoll il-konċentrazzjoni tagħha jridu jkunu magħrufin bl-eżatt. Iridu jittieħdu prekawzjonijiet sabiex jiġi eskluż id-diossidu tal-karbonju. Dettalji dwar il-proċedura, il-prekawzjonijiet, u l-kalkolu jingħataw f'testijiet standard, eż. referenzi (1), (2), (3), (4).

Il-metodu spettrofotometriku

Tul tal-mewġa jinstab meta l-forom jonizzati u mhux jonizzati tas-sustanzi jkollhom koeffiċjenti ta' estinzjoni konsiderevolment differenti. L-ispettru ta' assorbiment tal-UV/VIS jinkiseb minn soluzzjonijiet ta' konċentrazzjoni kostanti taħt kundizzjoni tal-pH li fiha s-sustanza essenzjalment ma tkunx jonizzata u kompletament jonizzata u f'bosta pHs intermedji. Dan jista' jsir, jew billi jiżdiedu inkrementi ta' aċidu kkonċentrat (bażi) ma' volum relattivament kbir ta' soluzzjoni tas-sustanza f'bafer b'bosta komponenti, inizjalment f'pH għolja (baxxa) (ref. 5), jew billi jiżdiedu volumi ndaqs ta' soluzzjoni ewlenija tas-sustanza, pereżempju fl-ilma, il-metanol, ma' volumi kostanti ta' bosta soluzzjonijiet mewwieta li jkopru l-medda ta' pH mixtieqa. Mill-valuri tal-pH u l-assorbiment fit-tul tal-mewġa magħżula, jiġi kkalkolat numru suffiċjenti ta' valuri għall-pK_a billi tintuża dejta minn tal-inqas 5 pHs meta s-sustanza tkun tal-inqas 10 fil-mija u inqas minn 90 fil-mija jonizzata. Id-dettalji sperimentali ulterjuri u l-metodu ta' kalkolu jintgħataw fir-referenza (1).

▼M7

Il-metodu konduttometriku

Bl-użu ta' ċellola ta' kostant żgħir u magħruf taċ-ċellola, titkejjel il-konduttività ta' soluzzjoni ta' madwar 0.1 M tas-sustanza f'ilma tal-konduttività. Jitkejlu wkoll il-konduttivitajiet ta' numru ta' dilwizzjonijiet li jsiru bi preċiżjoni ta' din is-soluzzjoni. Il-konċentrazzjoni titnaqqas bin-nofs kull darba, u s-serje għandha tkopri tal-inqas ordni ta' kobor fil-konċentrazzjoni. Il-konduttività ta' limitazzjoni f'dilwizzjoni infinita tinstab billi jsir esperiment simili b'melħ NA u bl-estrapolazzjoni. Imbagħad il-grad ta' dissoċjazzjoni jkun jista' jiġi kkalkolat mill-konduttività ta' kull soluzzjoni bl-użu tal-ekwazzjoni Onsager, u b'hekk bl-użu tal-Liġi ta' Dilwizzjoni Ostwald jista' jiġi kkalkolat il-kostant ta' dissoċjazzjoni bħala $K = \alpha^2C/(1 – \alpha)$ fejn C hija l-konċentrazzjoni f'moli kull litru u α hija l-frazzjoni dissoċjata. Iridu jittieħdu prekawzjonijiet sabiex jiġi eskluż is-CO_2. Id-dettalji sperimentali ulterjuri u l-metodu ta' kalkolu jintgħataw fit-testi standard u fir-referenzi (1), (6) u (7).

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

Il-metodu ta' Winkler

Il-pK_a hija kkalkolata għal 10 punti mkejlin fuq il-kurva ta' titrazzjoni. Jiġu kkalkolati d-devjazzjoni medja u d-devjazzjoni standard tat-tali valuri pK_a. Plott tal-pH kontra l-volum tal-bażi jew l-aċidu standard għandha tkun inkluża flimkien ma' preżentazzjoni f'tabelli.

Il-metodu spettrofotometriku

L-assorbiment u l-pH huma mqegħdin f'tabella minn kull spettru. Tal-inqas ħames valuri għall-pK_a huma kkalkolati mill-punti ta' data tal-ispettri intermedji, u jiġu kkalkolati d-devjazzjoni medja u dik standard ta' dawn ir-riżultati wkoll.

Il-metodu konduttometriku

Il-konduttività ekwivalenti Λ hija kkalkolata għal kull konċentrazzjoni tal-aċidu u għal kull konċentrazzjoni ta' taħlita ta' ekwivalenti ta' aċidu, flimkien ma' 0.98 ekwivalenti ta' idrossidu tas-sodju mingħajr karbonat. L-aċidu huwa eċċessiv sabiex jiġi evitat OH^- eċċessiv minħabba l-idroliżi. 1/Λ tiġi pplottjata kontra Λ _ tal-melħ tista' tinstab bl-estrapolazzjoni għal konċentrazzjoni żero.

Λ_o tal-aċidu tista' tiġi kkalkolata billi jintużaw il-valuri tat-tagħrif għal H^+ u Na^+. Il-pK_a tista' tiġi kkalkolata minn $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ u $K_a = \alpha^2C/(1 – \alpha)$ għal kull konċentrazzjoni. Valuri aħjar għall-K_a jistgħu jinkisbu billi jsiru korrezzjonijiet għall-mobilità u l-attività. Għandhom jiġu kkalkolati d-devjazzjoni medja u d-devjazzjoni standard tal-valuri pK_a.

Rapport tat-test

Id-dejta mhux ipproċessata u l-valuri pK_a kkalkolati kollha għandhom jiġu sottomessi flimkien mal-metodu ta' kalkolu (idealment f'forma ta' tabelli, kif issuġġerit fir-ref. 1) u hekk ukoll il-parametri statistiċi deskritti iktar 'il fuq. Għall-metodi ta' Winkler, għandhom jingħataw id-dettalji tal-istandardizzazzjoni tas-soluzzjonijiet titrati.

Għall-metodu spettrofotometriku, għandhom jiġu sottomessi l-ispettri kollha. Għall-metodu konduttometriku, għandhom jiġu rrapportati d-dettalji tad-determinazzjoni tal-kostant taċ-ċelloli. Għandha tingħata informazzjoni dwar it-teknika użata, il-metodi analitiċi u l-għamla ta' kwalunkwe bafer użat.

Għandha tiġi rrapportata t-temperatura (jew temperaturi) tat-test.

TAGĦRIF

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (see above (4)).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

PARTI B: METODI GĦAD-DETERMINAZZJONI TAT-TOSSIĊITÀ U EFFETTI OHRA TAS-SAĦĦA

WERREJ

DAĦLA ĠENERALI

B.1.bis. TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA – PROĊEDURA GĦAL DOŻA FISSA

B.1.tris. TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA – METODU TAL-KLASSIFIKA TOSSIKA AKUTA

B.2. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA

B.3. TOSSIĊITÀ AKUTA (DERMALI)

B.4. IRRITAZZJONI DERMALI AKUTA/KORRUŻJONI

B.5. IRRITAZZJONI AKUTA TAL-GĦAJNEJN/KORRUŻJONI

B.6. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA

B.7. STUDJU DWAR IT-TOSSIĊITÀ ORALI TA' DOŻA RIPETUTA KULL 28 JUM FIR-RODITURI

B.8. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI SUBAKUTA: STUDJU TA' 28 JUM

B.9. DOŻI REPETUTI (28 jum) TOSSIĊITÀ (DERMALI)

B.10. TEST *IN VITRO* TA' ABERRAZZJONI KROMOŻOMIKA FIL-MAMMIFERI

B.11. TEST TAL-ABERRAZZJONI FIL-KROMOŻOMI TAL-MUDULLUN TAL-MAMMIFERI

B.12. TEST TAL-MIKRONUKLEU FL-ERITROĊITI MAMMIFERI

B.13/14. MUTAĠENIĊITÀ – TEST TA' MUTAZZJONI RIVERSIVA TA' BATTERJI

B.17. TESTIJIET *IN VITRO* TAL-MUTAZZJONI ĠENETIKA FUQ ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI BL-UŻU TAL-ĠENI HPRT U XPRT

B.21. TEST TAT-TIBDIL TAL-ĠENI F'ĊELLULI MAMMIFERI *IN VITRO*

B.22. TEST LETALI DOMINANTI TAR-RODITURI

▼B

B.23. TEST TAL-ABERRAZZJONI FIL-KROMOŻOMI SPERMATOGONI TAL-MAMMIFERI

B.25. IT-TRASLOKAZZJONI TAL-ĠRIEDEN LI TITTIEĦED

B.26. EŻAMI TA' TOSSIĊITA ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻA GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊJI TA' ANNIMALI GERRIEMA

B.27. EŻAMI TA' TOSSIĊITÀ ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻI GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊI TA' ANNIMALI MHUX GERRIEMA

B.28. STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ DERMALI SUB-KRONIKA STUDJU DERMALI TAD- DOŻA RIPETUT GĦAL 90 ĠURNATA LI JUŻA SPEĊI TA' MAMMALI GERRIEMA

B.29. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI SUBKRONIKA: STUDJU TA' 90 JUM

B.30. STUDJI DWAR TOSSIĊITÀ KRONIKA

B.31. STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ FL-IŻVILUPP PRENATALI

B.32. STUDJI DWAR IL-KARĊINOĠENIĊITÀ

B.33. STUDJI KONĠUNTI DWAR TOSSIĊITÀ KRONIKA/KARĊINOĠENIĊITÀ

B.34. TEST TA' TOSSIĊITÀ FUQ IR-RIPRODUZZJONI FUQ ĠENERAZZJONI WAĦDA

B.35. STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ REPRODUTTIVA FUQ ŻEWĠ ĠENERAZZJONIJIET

B.36. TOSSIKOKINETIĊI

B.37. ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIĊITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* WARA L-ESPOŻIZZJONI AKUTA

B.38. ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIĊITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* STUDJU TA' DOŻA RIPETUTTA GĦAL 28 ĠURNATA

B.39. TEST *IN VIVO* TA' SINTESI MHUX PROGRAMMATA TA' DNA (UDS) FUQ ĊELLULI TAL-FWIED TAL-MAMMIFERI

B.40. KORRUŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IL-METODU TA' TTESTJAR TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANJA (TER))

B.40.BIS. KORRUŻJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: METODU TA' TTESTJAR TAL-EPIDERMIS UMAN RIKOSTITWIT (RhE)

B.41. IT-TEST TAL-FOTOTOSSIĊITÀ *IN VITRO* 3T3 NRU

B.42. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULA TAL-LIMFA LOKALI

▼B

B.43. STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSIĊITÁ FL-ANNIMALI GERRIEMA

B.44. L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VIVO*

B.45. L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VITRO*

B.46. IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-*EPIDERMIS* UMAN RIKOSTITWIT

B.47. METODU TAT-TEST TAL-OPAĊITÀ U L-PERMEABILITÀ TAL-KORNEA FIL-BOVINI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' I) SUSTANZI KIMIĊI LI JINDUĊU ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN U II) SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GĦAL IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

B.48. METODU TA' TTESTJAR TAL-GĦAJNEJN TAT-TIĠIEĠ IŻOLATI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' I) SUSTANZI KIMIĊI LI JINDUĊU ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN U II) SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GĦAL IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

B.49. TEST *IN VITRO* TAL-MIKRONUKLEU TAĊ-ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI

B.50. TEST *IN VITRO* TAL-MIKRONUKLEU TAĊ-ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI

B.51. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULU LIMFATIKU LOKALI BRDU-ELISA

B.52. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA – METODU TA' KLASSI AKUTA TOSSIKA

B.53. STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSIĊITÀ TAL-IŻVILUPP

B.54. BIJOASSAĠĠ UTEROTROFIKU F'RODITURI: TEST TA' TGĦARBIL TA' TERMINU QASIR GĦAL PROPRJETAJIET ESTROĠENIĊI

B.55. BIJOASSAĠĠ HERSHBERGER F'FIRIEN: ASSAĠĠ TA' TGĦARBIL TA' TERMINU QASIR GĦAL PROPRJETAJIET (ANTI)ANDROĠENIĊI

B.56. STUDJU ESTIŻ TAT-TOSSIĊITÀ RIPRODUTTIVA TA' ĠENERAZZJONI WAĦDA

B.57. H295R ASSAĠĠ TAL-ISTEROJDOĠENESI

B.58. ASSAĠĠI TAL-MUTAZZJONI TAL-ĠENI SOMATIĊI U TAĊ-ĊELLOLI TAL-ĠERMI TA' RODITURI TRANSĠENIĊI

B.59. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠLDA IN CHEMICO: ASSAĠĠ DIRETT TAR-REATTIVITÀ TAL-PEPTIDI (DPRA)

B.60. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: METODU TA' TTESTJAR TAL-ARE-NRF2 LUCIFERASE

B.61. METODU TA' TTESTJAR TAT-TNIXXIJA TA' FLUWOREXXEINA GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' KORRUŻIVI OKULARI U IRRITANTI SEVERI

B.62. ASSAĠĠ *IN VIVO* KOMETA TAL-ALKALINI TAL-MAMMIFERI

▼**B**

B.63. TEST TA' SKRINJAR TAT-TOSSIĊITÀ RIPRODUTTIVA/TAL-IŻVILUPP

B.64. STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ B'DOŻA RIPETUTA KOMBINAT MAT- TEST TA SKRINJAR TAT-TOSSIĊITÀ RIPRODUTTIVA/TAL-IŻVILUPP

B.65. METODU TA' TTESTJAR *IN VITRO* TAL-BARRIERA TAL-MEMBRANA GĦALL-KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

B.66. ASSAĠĠI *IN VITRO* TA' TRANSATTIVAZZJONI TRANSFETTATI B'MOD STABBLI BIEX JIĠU INDIVIDWATI AGONISTI U ANTAGONISTI RIĊETTURI TAL-ESTROĠENU

B.67. TESTIJIET *IN VITRO* TAL-MUTAZZJONI ĠENETIKA FUQ ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI BL-UŻU TAL-ĠENE TIMIDINA KINAŻI

B.68. METODU TA' TTESTJAR IN VITRO B'ESPONIMENT GĦAL ĦIN QASIR GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI i) TA' SUSTANZI KIMIĊI LI JINDUĊU ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN U ii) TA' SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW GĦAL ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

B.69. METODU TA' TTESTJAR TAL-EPITELJU BĦALL-KORNEA UMANA RIKOSTITWITA (RhCE) GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI U TIKKETTAR GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW GĦAL ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

B.70. ASSAĠĠI *IN VITRO* TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU RIKOMBINANTI UMAN (hrER) BIEX JIĠU INDIVIDWATI SUSTANZI KIMIĊI B'AFFINITÀ GĦALL-IRBIT TAL-ER

B.71. ASSAĠĠI *IN VITRO* DWAR IS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA LI JINDIRIZZA L-AVVENIMENT EWLIENI FL-ATTIVAZZJONI TAĊ-ĊELLOLI DENDRITIĊI FUQ IL-PERKORS TAL-EŻITU AVVERS (AOP) GĦAS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA

▼B

DAĦLA ĠENERALI

A. **KARATTERIZZAZZJONI TAS-SUSTANZA GĦAT-TEST**

Il-kompożizzjoni tas-sustanza għat-test, inklużi l-impuritajiet l-iktar importanti, u l-proprjetajiet fiżiko-kimiċi relevanti tagħha inkluża l-istabilità, għandha tkun magħrufa qabel il-bidu ta' kwalunkwe studju għat-tossiċità.

Il-proprjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza għat-test jagħtu informazzjoni importanti fl-għażla election of the route of administration, the design of each particular study and the handling and storage of the test substance.

L-iżvilupp ta' metodu analitiku għad-determinazzjoni tas-sustanza għat-test (inklużi l-impuritajiet prinċipali meta hu possibbli) fil-midjum tad-dożaġġ u l-materjal bijoloġiku għandu jiġi qabel il-bidu ta' l-istudju.

L-informazzjoni kollha li għandha x'taqsam ma' l-identifikazzjoni, il-proprjetajiet fiżiko-kimiċi, il-purità, u l-imġiba tas-sustanza għat-test għandhom jiġu inklużi fir-rapport tat-test.

B. **KURA TA' L-ANNIMALI**

Il-kontroll strett tal-kundizzjonijiet ambjentali u l-kura b'sengħa ta' l-annimali huma essenzjali fl-ittestjar tat-tossiċità

(i) *Il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew l-annimali*

Il-kundizzjonijiet ambjentali fil-kmamar sperimentali jew l-ispazji magħluqa ta' l-annimali għandhom ikunu xierqa għall-ispeċi li se jiġu ttestjati. Għall-firien, ġrieden u fniek ta' l-indi, il-kundizzjonijiet xierqa huma temperatura tal-kamra ta' 22 °C ± 3 °C b'umdità relattiva minn 30 sa 70 %; għall-fniek it-temperatura għandha tkun ta' 20 °C ± 3 °C b'umdità relattiva minn 30 sa 70 %.

Ċerti tekniki sperimentali huma partikularment sensittivi għall-effetti tat-temperatura u, f'dawn il-każijiet, id-dettalji tal-kundizzjonijiet xierqa huma inklużi fid-deskrizzjoni tal-metodu tat-test. Fl-investigazzjonijiet kollha ta' l-effetti tossiċi, it-temperatura u l-umdità għandhom jiġu mmoniterjati, irrekordjati, u inklużi fir-raport finali ta' l-istudju.

Id-dwal għandhom ikunu artifiċjali, is-sekwenza għandha tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Id-dettalji tas-sekwenza tad-dwal għandhom jiġu rrekordjati u inklużi fir-rapport finali ta' l-istudju.

Sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor fil-metodu, l-annimali jistgħu jitpoġġew individwalment, jew jinqaflu fi gruppi żgħar ta' l-istess sess; biex jinqaflu fi grupp, m'għandux ikun hemm iktar minn ħames annimali f'kull gaġġa.

Fir-rapporti ta' l-esperimenti fuq l-annimali, huwa importanti li jidher ċar kif qed jiġu maqfula l-annimali u n-numru ta' annimali mpoġġija f'kull gaġġa kemm waqt l-espożizzjoni għall-kimika u kemm waqt kwalunkwe perjodu ta' osservazzjoni li jiġi wara.

▼B

(ii) *Kundizzjonijiet ta' l-għalf*

Id-dieti għandhom jissodisfaw il-ħtiġiet nutrizzjonali kollha ta' l-speċi li qed jiġu ttestjati. Fejn jiġu amministrati s-sustanzi għat-test fid-dieta ta' l-annimali il-valur nutrizzjonali jista' jonqos permezz ta' l-effett li s-sustanza u l-kostitwent tad-dieta jagħmlu fuq xulxin. Il-possibbiltà ta' reazzjoni bħal din għandha tiġi meqjusa meta jiġu interpretati ir-riżultati tat-testijiet. Id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu jintużaw b'forniment illimitat ta' ilma għax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mil-ħtieġa li tiġi żgurata taħlita xierqa tas-sustanza għat-test meta tiġi somministrata b'dan il-metodu.

Il-kontaminanti tad-dieta li jinfluwenzaw it-tossiċità m'għandhomx ikunu preżenti f'konċentrazzjonijiet li jinterferixxu.

C. **ITTESTJAR ALTERNATTIV**

L-Unjoni Ewropea għandha l-impenn li tippromwovi l-iżvilupp u l-validazzjoni ta' tekniki alternattivi li jistgħu jipprovdu l-istess livell ta' informazzjoni bħala testijiet kurrenti għall-annimali, iżda li jużaw inqas annimali, jikkawżaw inqas tbatija jew jevitaw kompletament l-użu ta' annimali.

Metodi bħal dawn, meta jsiru disponibbli, għandhom jiġu kkunsidrati fejn hu possibbli għall-karatterizzazzjoni tal-periklu u l-klassifikazzjoni u l-ittikettjar konsegwenti għall-perikli intrinsiċi u l-valutazzjoni għas-sigurtà tal-kimika.

D. **EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI**

Meta t-testijiet jiġu evalwati u interpretati, il-limitazzjonijiet safejn ir-riżultati ta' l-istudji ta' l-annimali u ta' l-in *vitro* jistgħu jkunu estrapolati direttament lill-bniedem iridu jiġu kkunsidrati u għal-hekk, l-evidenza ta' effetti avversi fil-bnedmin, fejn huma disponibbli, jistgħu jintużaw għall-konfermazzjoni tar-riżultati ta' l-ittestjar.

E. **REFERENZI TA' LETTERATURA**

Bosta minn dawn il-metodi huma żviluppati fi ħdan l-istruttura tal-programm OECD *Testing Guidelines*, u għandhom isiru skond il-prinċipji tal-*Good Laboratory Practice*, sabiex jiżguraw 'l-aċċettazzjoni reċiproka tad-data' kemm jista' jkun.

Informazzjoni addizzjonali tinsab fir-referenzi msemmija fil-linji gwida ta' l-OECD u l-etteratura relevanti ppubblikata x'imkien ieħor.

▼B

B.1 BIS. **TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA – PROĊEDURA GĦAL DOŻA FISSA**

1. **METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalenti għal OECD TG 420 (2001)

1.1. DAĦLA

Il-metodi tradizzjonali għall-istudju tat-tossiċità akuta bl-użu tal-mewt ta' l-annimali bħala l-għan ewlieni. Fil-1984, resqien ġdid dwar it-testijiet tat-tossiċità akuta kien ġie suġġerit mill-British Toxocology Society li huwa ibbażat fuq l-amministrazzjoni f'serje ta' livelli ta' doži fissi (1). Ir-resqien evita l-użu tal-mewt ta' l-annimali bħala l-għan ewlieni, u minflok straħ fuq l-osservazzjonijiet ta' sinjali ċari tat-tossiċità f'wieħed mis-serje ta' livelli ta' doži fissi. Bsegwiment ta' studji *in vivo* tal-validazzjoni fil-UK (2) u f'medda internazzjonali (3), il-proċedura kienet adottata bħala metodu tat-test fil-1992. Sussegwentament, il-propjetajiet statistiċi tal-Proċedura ta' Doża Fissa kienu ġew evalwati bl-użu ta' mudelli matematiċi f'serje ta' studji (4) (5) (6). Flimkien, l-istudji *in vivo* u l-mudellar kienu were li l-proċedura hija riproduċibbli, bl-użu anqas ta' annimali u tikkawża anqas tbagħtija mill-metodi tradizzjonali u hija kapaċi li tiggrada s-sustanzi f'manjera simili mal-metodi l-oħrajn tat-testijiet tat-tossiċità akuta.

Gwida dwar l-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq għal skop partikolari tista' tinstab fid-Dokument ta' Gwida dwar it-Testijiet tat-Tossiċità Akuta Orali (7). Dan id-Dokument ta' Gwida fih ukoll informazzjoni addizzjonali dwar it-twettieq u l-interpretazzjoni tal-Metodu tat-test B.1 bis.

Huwa prinċipju tal-metodu li fl-istudju ewlieni doži tossiċi moderati biss ikunu użati, u li l-amministrazzjoni tad-doži li jkunu mistenna bħala letali għandhom ikunu evitati. Ukoll, id-doži li huma magħrufa bħala li jikkawżaw uġiegħ u tqallib żejjed, minħabba l-azzjonijiet korrossivi jew ta' irritazzjoni qawwija, ma jkunx hemm ħtieġa li jkunu amministrati. Annimali moribondi, jew annimali li ovvjament ikunu bl-uġiegħ jew li juru sinjali ta' tqallib sever u dewwiemi għandhom ikunu maqtula b'mod uman, u huma meqjusa fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bl-istess mezz bħal dawk l-annimali li jkunu mietu waqt it-test. Il-kriterja ta' kif tittieħed id-deċiżjoni sabiex ikunu maqtula l-annimali moribondi jew dawk li jkunu fi tbagħtija kbira, u l-gwida għar-rikonoxximent ta' mewt prevista jew mistennija, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida separat (8).

Il-metodu jipprovdi informazzjoni dwar il-propjetajiet perikoluži u jippermetti li s-sustanza tkun iggradata u ikklassifikata skond il-Globally Harmonised System (GHS) (Sistema Armonizzata Globali) għall-klassifika ta' kimika li toħloq tossiċità akuta (9).

Il-laboratorju tat-test għandu jikkonsidra l-informazzjoni disponibbli kollha dwar is-sustanza tat-test qabel ma jwettaq l-istudju. Tali informazzjoni għandha tinkludi l-identifikaazzjoni u l-istruttura kimika tas-sustanza; il-propjetajiet fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' xi testijiet oħrajn *In vitro* jew *in vivo* dwar is-sustanza' id-dettalji tossikoloġiċi dwar sustanzi struttalment relatati; u l-użu(i) antiċipati tas-sustanza. Din l-informazzjoni hija meħtieġa sabiex tissodisfa lil dawk kollha ikkonċernati li t-test huwa relevanti għall-protezzjoni tas-saħħa umana, u li jkun jgħin fil-għażla ta' doża xierqa għal-bidu.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċita akuta orali: Tirreferi għall-effetti ħżiena li jseħħu wara l-amministrazzjoni orali ta' doża waħda ta' sustanza jew doži multipli, matul 24 siegħa.

Mewt imdewma: Tfisser li l-annimal ma jkunx u ma jidhirx moribond fi żmien 48 siegħa, imma li jmut aktar tard matul il-perjodu ta' osservazzjoni ta' 14-il jum.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test li tkun somministrata. Id-doża hija espressa bħala l-piż tas-susatanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal tat-test (eż. mg/kg).

Tossiċità evidenti: Hija terminoloġija ġenerali li tiddeskrivi sinjali ċari tat-tossiċita bħala segwiment ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test (ara (3) għall-eżempji) bħal ma hija d-doża fissa segwenti aktar għolja li toħloq uġiegħ waqqi jew sinjali dewwiema ta' tbagħtija qawwija, l-istatus ta' moribond (il-kriterja hija ippreżentatha fil-Humane Endpoints Guidance Document (8) (Dokument ta' Gwida dwar l-Għanijiet Umani)), jew li l-probabbiltà ta' mortalità f'bosta annimali tista' tkun mistennija.

GHS: *Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*. (Sistema tal-Klassifikazzjoni Armonizzata Globali dwar Sustanzi u Taħlitiet Kimiċi.) Attività konġunta tal-OECD (is-saħħa umana u l-ambjent), il-Kumitat tan-NU ta' l-Esperti dwar it-Trasport ta' Oġġetti Perikoluži (il-propjetajiet fiżiċi/-kimiċi) u l-ILO (kommunikazzjoni ta' periklu) u kordinata mill-Programm Interorganizzazzjonali għal Amministrazzjoni Soda tal-Kimika (IOMC).

Mewt iminenti: Meta l-istat ta' moribond jew mewt ikun mistenni qabel il-ħin ta' l-osservazzjoni segwenti ippjanata. Sinjali indikattivi ta' dan l-istat f'annimali gerriema jistgħu jinkludu konvulżjonijiet, posizzjoni laterali, mimduda, u roda. (Ara d-Dokument ta' Gwida dwar l-Umanita Immirata (8) għal aktar dettalji).

LD_{50} (doża letali medja): Hija akkwistata b'mod statistiku minn doża waħda ta' sustanza li tista' tkun mistennija li tikkaġuna mewt f'50 fil-mija ta' l-annimali meta amministrati permezz tar-rotta orali. Il-valur LD_{50} huwa espress f'termini ta' piż tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal tat-test (mg/kg).

Limitu tad-doża: Tirreferi għal doża fil-litu l-aktar għoli tagħha waqt it-testijiet (2 000 jew 5 000 mg/kg).

L-istat moribondi: Huwa l-istat ta' qabel il-mewt jew ta' l-inabbiltà tas-sopravivenza, anki jekk ikun hemm trattament. (Ara d-Dokmunet ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (8) dwar aktar dettalji).

Mewt mistennija: Il-preżenza ta' sinjali kliniċi indikattivi tal-mewt fi żmien mistenni jew inkella fil-ġejjieni imma qabel it-tmiem ippjanat ta' l-esperiment, per eżempju: l-inabbiltà li jersaq lejn l-ilma u lejn l-ikel. (Ara d-Dokmunet ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (8) dwar aktar dettalji).

▼B

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Gruppi ta' annimali ta' sess wieħed huma mogħtija doża fi proċedura mtarrġa bl-użu ta' dożi fissi ta' 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg (eċċezzjonalment għal doża fissa addizzjonali ta' 5 000 mg/kg li tista' tkun ikkonsidrata, ara s-sezzjoni 1.6.2.). Il-livell inizjali tad-doża huwa magħżul fuq il-bażi ta' l-istudju tas-sejbien bħala d-doża mistennija li tipproduċi xi sinjali ta' tassiċità mingħajr ma toħloq l-effetti ta' tossiċità severa jew tal-mortalità. Is-sinjali kliniċi u l- kundizzjonijiet assoċjati ma l-uġiegħ, sofferenza, u mewt iminenti, huma deskritti fid-dettall fi Gwida OECD separata, id-Dokument (8). L-annimali jistgħu jingħataw doża aktar għolja jew aktar baxxa, jiddependi mill-preżenza jew in-nuqqas ta' sinjali ta' tossiċità jew mortalità. Din il-proċedura tinżamm sakemm id-doża li toħloq tossiċità evidenti jew ta' mewt waħda jew aktar, ikunu identifikati, jew meta l-ebda effetti ma jkunu jidhru fid-doża l-aktar għolja jew meta l-imwiet iseħħu fid-doża l-aktar baxxa.

1.4. ID–DESKRIZZJONI TAL–METODU TAT–TEST

1.4.1. **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

L-ispeċi preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċi oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Normalment ikunu wżata il-femminili (7). Dan huwa minħabba li listħarriġ letterarju tat-testijiet konvenzjonali LD_{50} juru li normalment ikun hemm ftit differenza fis-sensittività bejn is-sessi, imma li f'dawk il-każi meta d-differenzi jkunu osservati, in-nisa ikunu ġeneralment kemm xejn aktar sensittivi (10). B'dana kollu, jekk tagħrif dwar il-propjetajiet tossikoloġiċi jew tossikinetiċi ta' kimiċi strutturament relatati jindika li l-irġiel aktarx li jkunu aktar sensittivi, allura dak is-sess għandu jkun użat. Meta t-test ikun imwettaq fuq maskili, ġustifikazzjoni adekwata għandha tkun ipprovduta.

Annimali żgħażagħ adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Kull annimal, fil-bidu ta' meta jkun sejjer jingħata doża, għandu jkun f'età ta' bejn 8 u 12 il-ġimgħa u l-piż tiegħu għandu jkun fil-medda ta' ± 20 % tal-piż medju ta' dawk l-annimali li preċedentament ikun u ntużaw għad-dożi.

1.4.2. **Il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-annimali jistgħu ikunu miġbura flimkien bħala grupp skond id-doża, imma n-numru ta' l-annimali f'kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjonijiet ċari ta' kull annimal.

1.4.3. **Preparazzjoni ta' l-annimali**

L-animmali għandhom ikunu magħżula kif jinzerta, immarkati sabiex jippermettu identifikazzjoni individwali, u miżmuma fil-gaġġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 tijiem qabel il-bidu tad-dożi sabiex jippermettu li jkunu akklamattiżati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

▼B

1.4.4. **Preparazzjoni tad-doża**

Ġeneralment, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu amministrati f'volum kostanti matul medda ta' doża tat-testijiet bil-varjazzjoni tal-konċentrazzjoni fil-preparazzjoni tad-doża. Meta, b'dana kollu, likwidu jew taħlita ikunu l-prodott finali, l-użu ta' sustanza tat-test mingħajr trattib, i.e. konċentrazzjoni kostanti, tista' tkun aktar relevanti għall-istudju susseġwenti tar-riskju ta' dik is-sustanza, u hija ħtieġa għal uħud mill-awtoritajiet regolatorji. Fi kwalunkwe każ, il-volum massimu tad-doża għall-amminsitrazzjoni m'għandux ikunu misbuq. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Fl-annimali gerriema, il-volum m'għandux normalment jeċċedi 1ml/100g tal-piż tal-ġisem: b'dana kollu fil-każ ta' taħlitiet akweji, 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jkun ikkonsidrat. Fir- rigward tal-formulazzjoni tal-preparazzjoni tad-doża, l-użu ta' taħlita/sospenzjoni/emulsifikazzjoni akweja hija rakkommandata kull meta possibbli, segwita f'ordni ta' preferenza bit-taħlita/sospenzjoni/emulsifikazzjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħ-ir-rum) u mbagħad il-possibbiltà ta' likwidi oħrajn. Għal likwidi oħrajn apparti milli l-ilma, il- karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. Id-doži għandhom ikunu ippreparati ftit qabel l-amministrazzjoni, sakemm l-istabbilità tal-preparazzjoni matul il-perjodu ta' l-użu tkun magħruha u turi li tkun aċċettabbli.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Amministrazzjoni tad-doża**

Is-sustanza tat-tes hija somministrata f'doża waħda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi intubazzjoni canula xierqa. F'ċirkostanzi mhux tas-soltu li fihom doża waħda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix l-24 siegħa.

L-annimali għandhom ikunu msajma qabel ma jingħataw id-doża (eż. għall-firien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul il-lejl sal-ħin ta' l-esperiment; fil-każ ta' ġurdien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul 3-4 siegħat). Wara l-perjodu tas-sawma, l-annimali għandhom ikunu miżuna u s-sustanza tat-test tkun somministrata. Wara li s-sustanza tat-test tkun somministrata, l-ikel jista' jkun imċaħħad għal 3-4 siegħat oħra fil-każ tal-firien jew 1-2 siegħat fil-każ tal-ġrieden. Meta d-doża tkun somministrata fi frazzjonijiet matul perjodu ta' żmien, jista' jkun meħtieġ li l-annimali jkunu ipprovduti b'ikel u ilma, jiddependi mit-tul tal-perjodu.

1.5.2. **Studju ta' l-osservazzjoni**

L-iskop ta' l-istudju ta' l-osservazzjoni huwa li jippermetti l-għażla xierqa tad-doża tal-bidu li tintuża fl-istudju ewlieni. Is-sustanza tat-test hija somministrata lill-annimali singoli b'manjera sekwenzali skond il-karti tan-nixxija fl-Anness 1. L-istudju ta' l-osservazzjoni ikunu komplut meta d-deċiżjoni dwar il-bidu tad-doża għall-istudju ewlieni tkun tista' tittieħed (jew jekk il-mewt tkun apparenti fid-doża l-baxxa kif stabbilita).

Id-doża tal-bidu għall-istudju ta' l-oisservazzjoni hija magħżulha minn livelli fissi ta' doži ta' 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg bħala doża mistennija li tipproduċi tossiċità evidenti ibbażata, meta possibbli, fuq evidenza mid-dettalji *In vivo* u *In vitro* mill-istess kimika jew il-kimiċi ta' struttura relatata. Fin-nuqqas ta' tali informazzjoni, id-doża tal-bidu għandha tkun 3000 mg/kg.

Perijodu ta' mill-anqas 24 siegħa għandu jkun imħolli bejn l-għoti tad-doża lil kull annimal. L-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal mil anqas 14-il jum.

▼B

B'mod eċċezzjonali, u biss meta iġġustifikat bi ħtiġiet regolatorji speċifiċi, l-użu ta' doża addizzjonali iffissata fil-livel għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkonsidrata (ara l-Anness 3). Għal raġunijiet li jikkonċernaw il-ġid ta' l-annimali, it-testijiet ta' l-annimali skond GHS, il-Kategorija 5, il-meded (2 000-5 000 mg/kg huma ferm skorraġiti u għandhom biss ikunu ikkonsidrati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu relevanza diretta għall-protezzjoni umana jew tas-saħħa ta' l-annimali jew dik ambjentali.

Fil-każi meta annimal ikun ittestjat fil-livell l-aktar baxx ta' doża fissa (5 mg/kg) fl-istudju ta' l-osservazzjoni imut, il-proċeduira normali hija li jkun terminat l-istudju u li s-sustanza tkun assanjata għal-GHS, Kategorija 1 (kif muri fl-Anness 1). B'dana kollu, jekk aktar konferma tal-klassifika tkun meħtieġa, proċedura supplementari voluntarja tista' tkun imwettqa, kif ġej: It-tieni annimal ikunu mogħti d-doża f'5 mg/kg. Jekk dan it-tieni annimal imut, allura il-Kategorija 1 GHS tkun ikkonfermata u l-istudju jkun terminat immedjetament. Jekk it-tieni annimali jibqa ħaj, allura massimu ta' tlett annimali addizjonali ikunu mogtoja d-doża ta' 5 mg/kg. Minħabba li jkun hemm riskju kbir ta' mortalità, dawn l-annimali għandhom ikunu mogħtija d-doża b'mod sekwenzali sabiex ikun imħares il-ġid ta' l-annimali. Fl-intervall ta' ħin bejn kull doża għal kull annimal għandu jkun suffiċjenti sabiex ikun stabbilit jekk l-annimal preċedenti jkunx sejjer jibqa ħaj. Jekk isseħħ it-tieni mewt, is-sekwenza tad-doża għandha tkun terminata immedjetament u l-ebda annimali oħrajn ma jingħataw id-doża. Minħabba l-okkorrenza tat-tieni mewt (irrispettivemanet min-numru ta' l-annimali ittestjati fil-waqt tat-terminazzjoni) tidħol fl-eżitu A (2 jew aktar imwiet), ir-regola tal-klassifika ta' l-Anness 2 fi 5 mg/kg doża fissa tkun segwita (il-Kategorija 1 jew ikun hemm 2 jew aktar imwiet, jew il-Kategorija 2 jekk ikun hemm mhux aktar minn mewt waħda). B'żieda, l-Anness 4 jagħti gwida dwar il-klassifika fis-sistema UE sakemm GHS ġdida tkun implementata.

1.5.3. **Studju ewlieni**

1.5.3.1. *Numru ta' l-annimali u l-livelli tad-doża*

L-azzjoni li għandha tittieħed b'segwiment tat-testijiet fid-doża tal-livell tal-bidu hija indikata fil-karti nixxija fl-Anness 2. Waħda mit-tlett azzjonijiet tkun meħtieġa; jew li jieqfu t-testijiet u li tkun assenjata l-klassifikazzjoni tal-klassi tal-periklu xierqa, it-test f'doża ta' livell għola jew test f'doża f'livell aktar baxx. B'dana kollu, għall-protezzjoni ta' l-annimali, livell ta' doża li jikkaġuna l-mewt fl-istudju ta' l-osservazzjoni m'għandhiex tkun użata mill-ġdid fl-istudju ewlieni (ara l-Anness 2). L-esperjenza wriet li r-riżultat probabbli fil-livell tad-doża tal-bidu ikun dak li s-sustanza tista' tkun klassifikata u li l-ebda aktar testijiet ma jkunu meħtieġa.

Total ta' ħames annimali ta' sess wieħes ikun normalment użat għal kull livell ta' doża investigata. Il-ħames annimali għandhom ikunu magħmula minn annimal wieħed mill-istudju ta' l-osservazzjoni li jkun ħa doża fil-livell magħżul flimkien ma erba annimali addizzjonali oħrajn (apparti, ħaġa mhux tas-soltu, jekk il-livell tad-doża użat ma kienx inkluż fl-istudju ta' l-osservazzjoni).

L-intervall tal-ħin bejn id-dożi f'kull wieħed mill-livelli huwa determinat bl-iskoppjar, it-tul, u s-severità, tas-sinjali tossiċi. It-trattament ta' l-annimali fid-doża segwenti għandu jkun imdewwem sakemm wieħed ikun żgur bis-sopravivenza ta' l-annimali li jkunu ireċevew id-doża preċedentament. Perijodu ta' minn 3 sa 4 ijiem bejn id-dożi f'kull livell huma rakkommandabbli, jekk maħtieġ, sabiex jippermetti għall-osservazzjoni tat-tossiċità mdewma. L-intervall tal-ħin jista' jkun aġġustat kif xieraq, eż. fil-każ ta' reazzjoni mhux konklussiva.

▼B

Meta l-użu tad-doża l-aktar għolja ta' 5 000 mg/kg ikun ikkonsidrat, il-proċedura kif elenkata fl-Appendiċi 3 għandha tkun segwita (ara wkoll is-sezzjoni 1.6.2.).

1.5.3.2. *Test tal-limitu*

It-test tal-limitu huwa primarjament użat f'sitwazzjonijiet meta dak li jwettaq l-esperiment ikollu informazzjoni li tindika li l-materjal tat-test ma jkunx tossiku, i.e. li jkollu tossiċita biss aktar mil-limitu regolatorju tad-doži. L-informazzjoni dwar it-tossiċità tal-materjal tat-test tista' tkun akkwistat mit-tagħrif dwar komposti simili li kienu ġew ittestjati jew minn taħlitiet jew prodotti simili li kienu ġew ittestjati, billi tkun meqjusa l-identità u l-persentaġġ tal-komponenti magħrufa li huma ta' sinifikanza tossikoloġika. F'dawk is-sitwazzjonijiet meta ftit jew l-ebda informazzjoni ma tkun disponibbli dwar it-tossiċità tagħha, jew meta l-materjal tat-test ikun mistenni li huwa tossiku, it-test ewlieni għandu jkun imwettaq.

Bl-użu tal-proċedura normali, studju ta' l-osservazzjoni li jibda b'doża ta' 2 000 mg/kg (jew b'mod eċċezzjonali 5 000 mg/kg) segwit b'doża fuq erba' annimali oħrajn f'dan il-livell iservi bħala test tal-limitu għal din il-linja ta' gwida.

1.6. OSSERVAZZJONIJIET

L-annimali osservati individwalment wara l-ewwel doża mill-anqas darba matul l-ewwel 30 minuta, perdodikament matul l-ewwel 24 siegħa, b'attenzjoni speċjali mogħtija matul l-ewwel 4 siegħat, u ta' kull minn hemm il-quddiem, għal total ta' 14-il jum, apparti minn meta jkun meħtieġ li dawn jitneħħew mill-istudju u li jkunu maqtula b'mod umanesk għal raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali jew inkella li jinsabu mejta. B'dana kollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandhux ikun iffissat b'mod rigoruż. Għandu jkun determinat bir-reazzjoni tossika, il-ħin ta' l-iskoppjar u t-tul tal-perjodu ta' l-irkupru, u jista' b'hekk ikun estiż meta ikkonsidrat bħala meħtieġ. Il-ħinijiet ta' meta jidhru jew jisparixxu s-sinjali tat-tossiċità huma importanti, speċjalment jekk ikun hemm tendenza li s-sinjali tossiċi jkunu mdewwma (11). L-osservazzjonijiet kollha huma sistematista'ment irreġistrati, b'dettalji individwali jkunu jinżammu għal kull annimal.

Osservazzjonijiet addizzjonali jkunu meħtieġa jekk l-annimali jkomplu juru sinjali ta' tossiċità. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu xi tibdil fil-ġilda u s-suf, l-għajnejn, fil-membrani mukaneji, u wkoll fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċi u tan-nervituri ċentrali, u l-attività somatomuturali u t-tip ta' l-imġieba. Attenzjoni għandha tkun diretta għall-osservazzjonijiet ta' roda, konvulżjonijiet, rieq, dijarrea, letarġija, irqad u koma. Il-prinċipji u l-kriterja kif aggruppati fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Miri Umanitarji għandhom ikunu ikkonsidrati (8). L-annimali misjuba f'kundizzjoni moribonda u l-annimali li juru sinjali ta' uġieħ qawwi jew li jgħaddu minn sinjali ta' tbgħatija, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju. Meta l-annimali jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji jew jekk jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jkun reġistrat bi preċiżjoni kemm jista' jkun possibbli.

1.6.1. **Piż tal-Ġisem**

Il-piżijiet ta' l-annimali individwali għandhom ikunu determinati kemxejn qabel ma s-sustanza tat-test tkun somministrata u mill-anqas darba fil-ġimgħa wara dan. Tibdiliet fil-piż għandhom ikunu ikkalkolati u rreġistrati. Fit-tmiem tat-test, l-annimali li jibqgħu ħajjin għandhom ikunu miżuna w imbagħas maqtula b'mod umanitarju.

▼B

1.6.2. **Patoloġija**

L-annimali kolha tat-test (inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jkunu mneħħija mill-istudju minħabba raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali) għandhom ikunu suġġetti għal nekropsija ġenerali. It-tibdiliet patoloġiċi ġenerali għandhom ikunu irreġistrati għal kull annimal. Eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi li juri evidenza patoloġika ġenerali fl- annimali li jibqgħu ħajjin għa 24 siegħa jew aktar wara li jkunu rċevew id-doża inizjali għandha wkoll tkun ikkunsidrata minħabba li din tista' tforni informazzjoni utili.

2. **DATA**

Data ta' l-annimal individwali għandha tkun ipprovduta. B'żieda ma dan, id-dettalji kollha għandhom ikunu miġbura f'sommarju, li juru għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali użati, in-numru ta' annimali ji jkollhom sinjali ta' tossiċità, in-numru ta' annimali li jinstabu mejta matul it-test jew li jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin tal-mewt ta' l-annimali individwali, deskrizzjoni u l-korsa tal-ħin ta' l-effetti tossiċi, u r-riversabbiltà ta' dawn, u s-sejbiet tan-nekropsija.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skond kif xieraq:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika, il-purità, u meta relevanti, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi (inkluża l- iżomerizzazzjoni);

— dettalji ta' l-identifikazzjoni, inkluż in-numru CAS.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

— speċi/tipi użati;

— l-istatus mikrobioloġiku ta' l-annimali, meta magħruf;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali (inklużi, meta xieraq, raġornament dwar l-użu ta' maskili minflok femminili);

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc.

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi dettalji dwar l-għamla fiżika tal-materjal amministrat;

— dettalji dwar l-amminstrazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi l-volumi tad-dożi u l-ħin ta' meta tkun ingħata id-doża;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma (inklużi t-tip/sorsi tad-dieta, is-sorsi ta' l-ilma);

— ir-raġjonar għall-għażla tad-doża tal-bidu.

▼B

Riżultati:

— tabulazzjoni tad-dettalji tar-reazzjoni u tal-livell tad-doża għal kull animal (i.e. l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi l-effetti tal-mortalità, in-natura, is-severanza u t-tul ta' l-effetti);

— tabulazzjoni tal-piż tal-ġisem u tat-tibdiliet fil-piż tal-ġisem;

— il-piżijiet ta' l-annimali individwali fil-jum ma meta jirċievi d-doża, u wara dan matul intervalli ta' darba fil-ġimgħa, u il-ħin tal-mewt jew ta' meta jkunu maqtula;

— id-data u l-ħin tal-mewt jekk qabel il-qtil previst;

— il-korsa tal-ħin ta' kif jiskoppjaw is-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kienux riversibbli għal kull animal individwali;

— is-sejbiet tan-nekropsija u s-sejbiet ħispatoloġiċi għal kull animal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

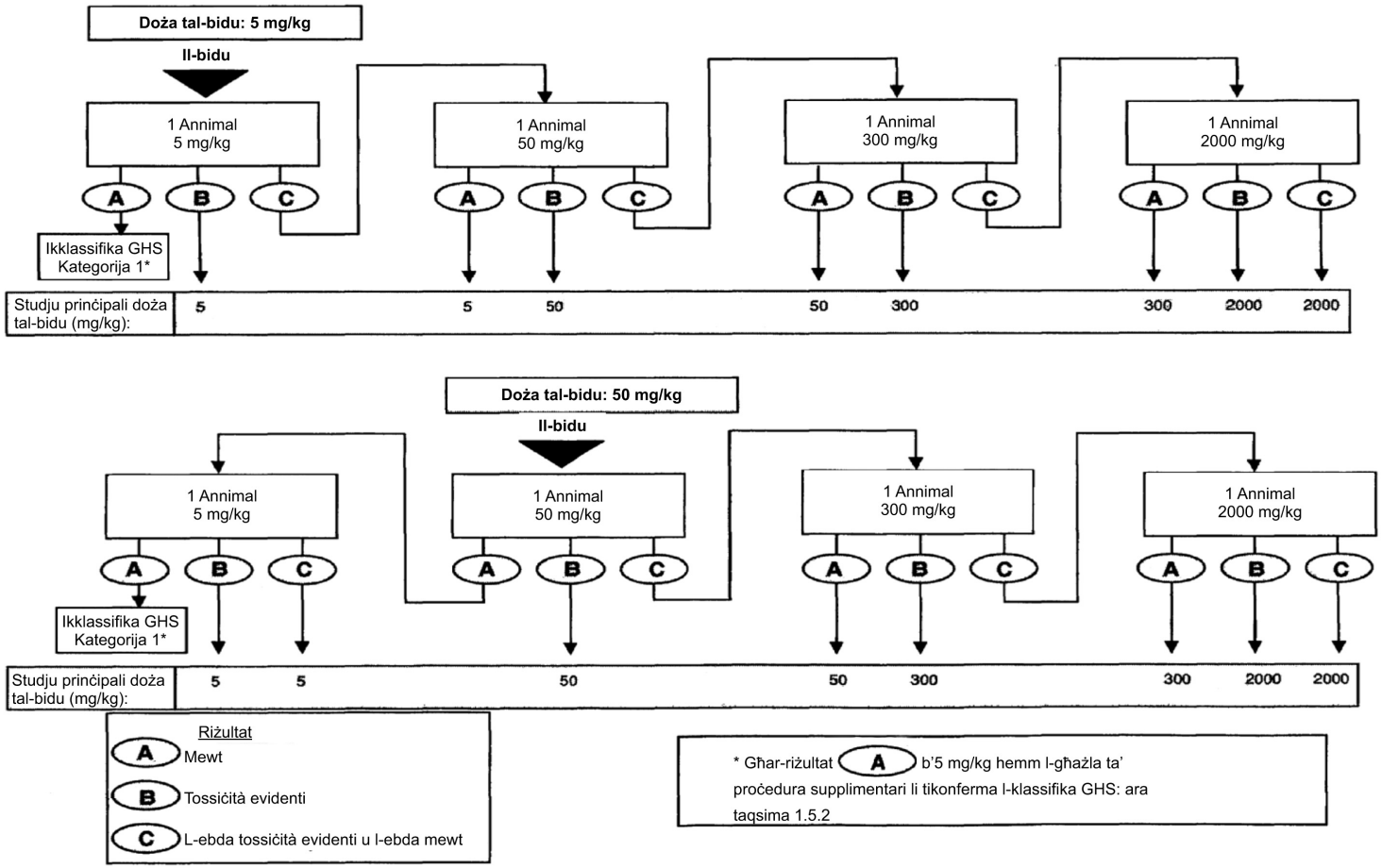
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 ġhttp://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.htmlħ.

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and- Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

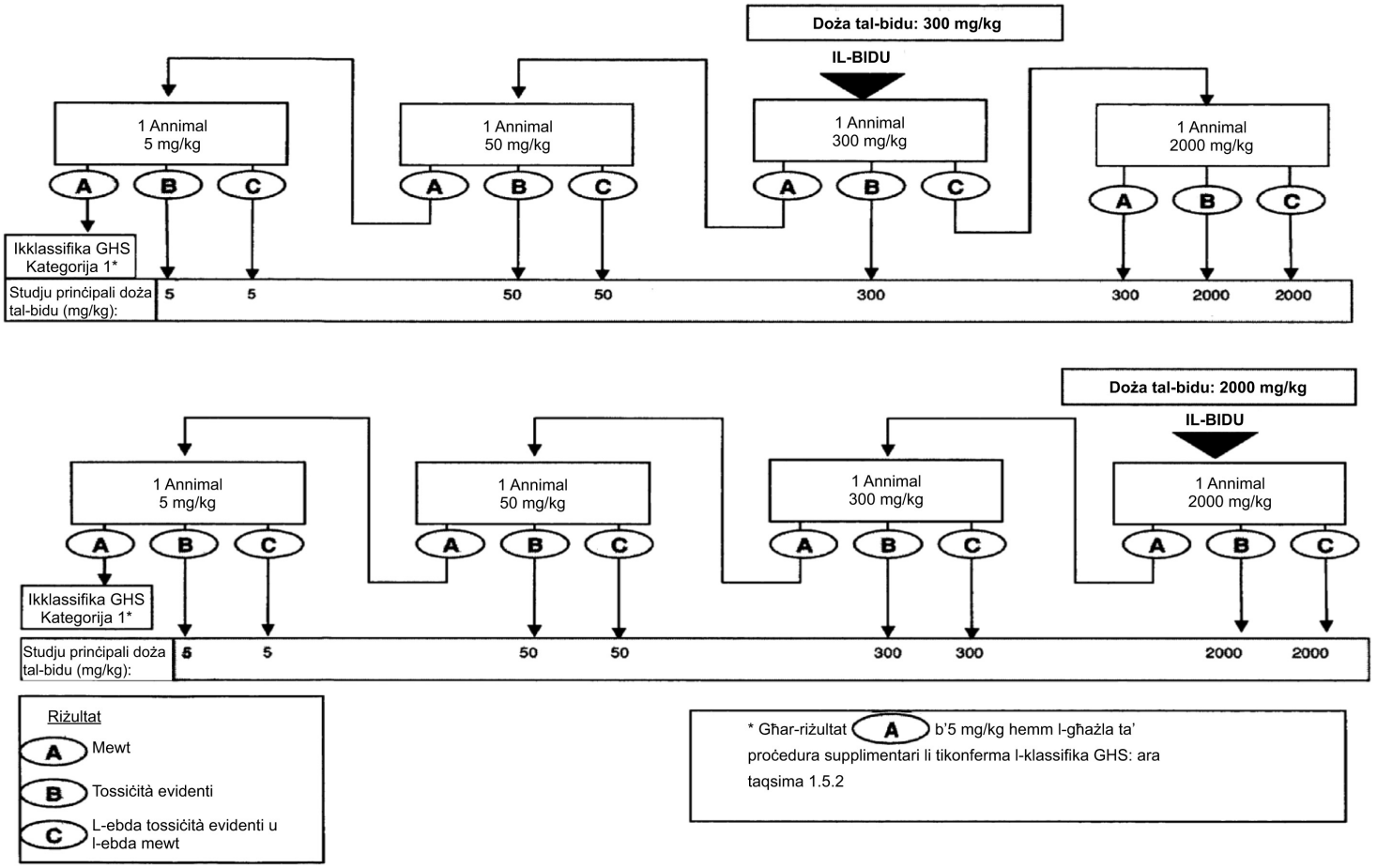
(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ANNESS 1

FLOW CHART DWAR L-ISTUDJU TA' OSSERVAZZJONI

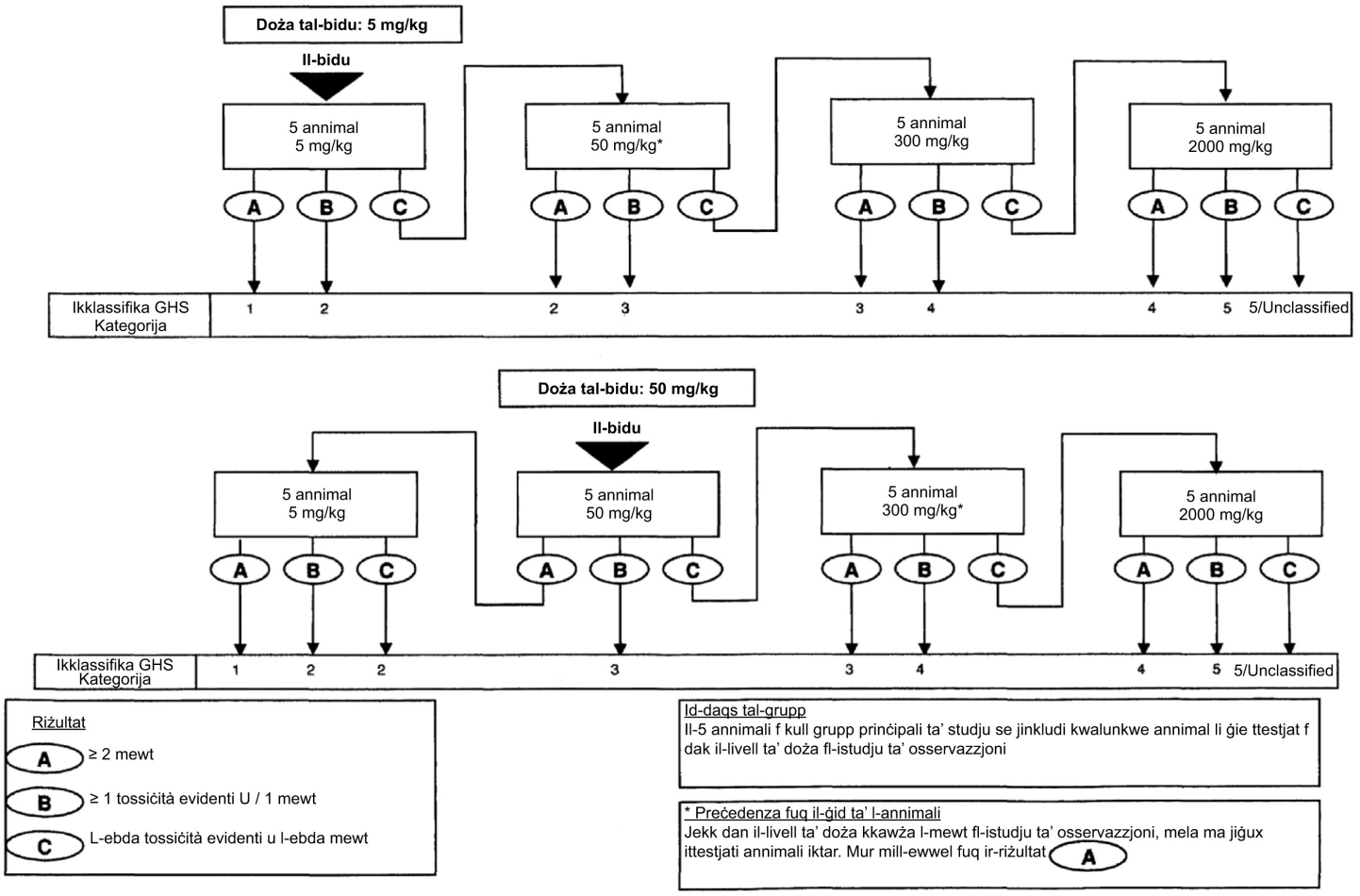


▼B

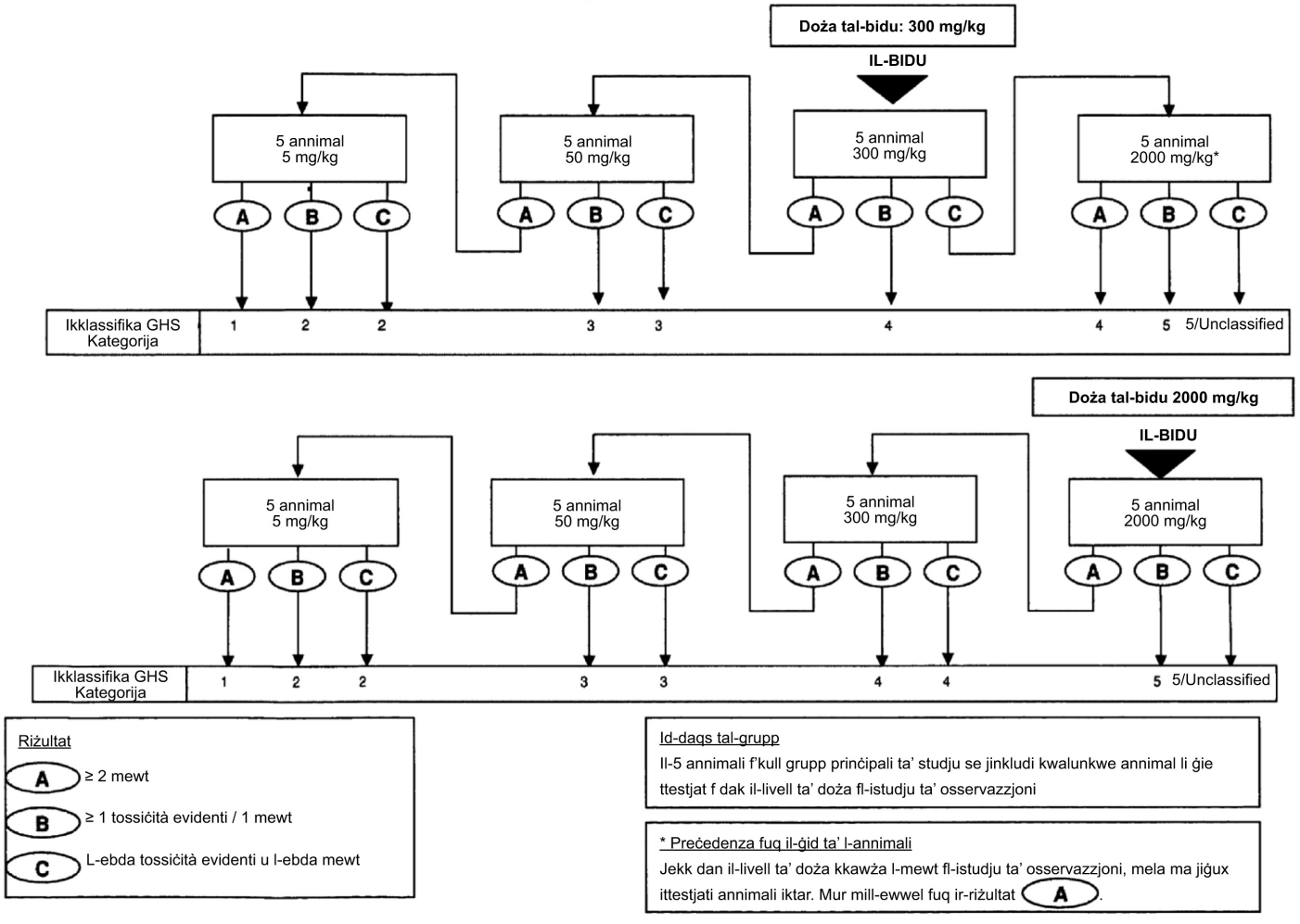

Doża tal-bidu: 300 mg/kg
IL-BIDU
1 Annimal 5 mg/kg
1 Annimal 50 mg/kg
1 Annimal 300 mg/kg
1 Annimal 2000 mg/kg
A
B
C
Ikklassifika GHS Kategorija 1*
Studju prinċipali doża tal-bidu (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Doża tal-bidu: 2000 mg/kg
IL-BIDU
1 Annimal 5 mg/kg
1 Annimal 50 mg/kg
1 Annimal 300 mg/kg
1 Annimal 2000 mg/kg
Ikklassifika GHS Kategorija 1*
Studju prinċipali doża tal-bidu (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Riżultat
A Mewt
B Tossiċità evidenti
C L-ebda tossiċità evidenti u l-ebda mewt
* Għar-riżultat A b'5 mg/kg hemm l-għażla ta' proċedura supplimentari li tikkonferma l-klassifika GHS: ara taqsima 1.5.2

ANNESS 2:

FLOW CHART DWAR L-ISTUDJU EWLIENI



▼B


Doża tal-bidu: 300 mg/kg
IL-BIDU
5 annimal 5 mg/kg
5 annimal 50 mg/kg
5 annimal 300 mg/kg
5 annimal 2000 mg/kg*
A B C
Ikklassifika GHS Kategorija
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Unclassified
Doża tal-bidu 2000 mg/kg
IL-BIDU
5 annimal 5 mg/kg
5 annimal 50 mg/kg
5 annimal 300 mg/kg
5 annimal 2000 mg/kg
A B C
Ikklassifika GHS Kategorija
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Unclassified
Riżultat
A ≥ 2 mewt
B ≥ 1 tossiċità evidenti / 1 mewt
C L-ebda tossiċità evidenti u l-ebda mewt
Id-daqs tal-grupp
Il-5 annimali f'kull grupp prinċipali ta' studju se jinkludi kwalunkwe annimal li ġie ttestjat f dak il-livell ta' doża fl-istudju ta' osservazzjoni
* Preċedenza fuq il-ġid ta' l-annimali
Jekk dan il-livell ta' doża kkawża l-mewt fl-istudju ta' osservazzjoni, mela ma jiġux ittestjati annimali iktar. Mur mill-ewwel fuq ir-riżultat A.

▼B

ANNESS 3

KRITERJI GĦALL-KLASSIFIKA TAS-SUSTANZI TAT-TEST B'VALURI MISTENNIJA TA' LD_{50} LI JEĊĊEDU 2 000 MG/KG MINGĦAJR IL-ĦTIEĠA TA' TESTIJIET

Il-kriterji dwar il-periklu tal-Kategorija 5 hija ntiża sabiex tiffaċilita l-identifikazzjoni tas-sustanzi tat-test li huma relattivament f'periklu ta' tossiċità akuta baxxa imma li, skond ċerti ċirkustanzi jistgħu jippreżentaw periklu għall-populazzjonijiet vulnerabbli. dawn is-sustanzi huma antiċipati li jkollhom LD_{50} orali jew tal-ġilda fil-medda ta' 2 000-5 000 mg/kg jew b'doži ekwivalenti għal rotot oħra. Is-sustanzi tat-test jistgħu jkunu kklassifikati fil-kategorija tal-periklu definita bi: 2 000 mg/kg $<LD_{50}<$ 5 000 MG/KG (Kategorija 5 fil-GHS) f'dawn il-każi li ġejjin:

a) jekk ikunu miġjuba f'din il-kategorija minn kwalunkwe skemi tat-testijiet ta' l-Anness 2, ibbażati fuq l-inċidenti tal-mortalità;

b) jekk evidenza affidabbli diġà tkun disponibbli li tindika li l-LD_{50} tkun fil-medda tal-valuri tal-Kategorija 5 jew li studji oħrajn dwar l-annimali jew ta' l-effetti tossiċi fil-bnedmin umani jindikaw tħassib għas-saħħa umana ta' natura akuta;

ċ) permezz ta' estrapolazzjoni, estimi jew kejl tad-dettalji jekk assenjati għal klassi aktar perikoluża milli mistħoqq u

— informazzjoni affidabbli kif disponibbli tindika effetti tossiċi sinifikanti fil-bnedmin, jew

— xi mortalità tkun osservata meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4 bir-rotta orali, jew

— meta ġudizzju minn esperti jikkonferma sinjali kliniċi sinifikanti ta' tossiċità, meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4, apparti milli għal dijarrea, piloerezzjoni jew dehra żmattata, jew

— meta ġudizzju minn esperti jikkonferma li l-informazzjoni affidabli tindika il-potenzjal għal effetti sinifikament akuti minn studji oħrajn fuq l-annimali.

TESTIJIET F'DOŻI OGĦLA MINN 2 000 MG/KG

B'mod eċċezzjonali u biss meta ġġustifikat bi ħtiġiet regolatorji speċifiċi, l-użu ta' doża addizzjonali ffissata fil-livell l-għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkunsidrata. Bir-rikonoxximent tal-ħtieġa li jkun mħares il-ġid ta' l-annimali, testijiet fi 5 000 mg/kg huma skuraġġiti u għandhom biss ikunu kunsidrati meta jkun hemm possibiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu relevanza diretta għall-ħarsien tas-saħħa ta' l-annimali jew dik umana (9).

Studju ta' l-osservazzjoni

Ir-regoli tad-deċiżjoni li jirregolaw il-proċedura sekwenzjali ppreżentata fl-Anness 1 huma estiżi sabiex jinkludu l-livell ta' doża 5 000mg/kg. Għalhekk, meta l-istudju ta' l-osservazzjoni li jibda b'doża ta' 5 000 mg/kg ikun użat, ir-riżultat A (mewt) ikun jeħtieġ it-tieni annimal li jkun ittestjat fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat B u C (tossiċità evidenti jew l-ebda tossiċità) ikunu jippermettu l-għażla ta' 5 000 mg/kg bħala d-doża tal-bidu fl-istudju ewlieni. Bl-istess mod, jekk id-doża tal-bidu apparti milli ta' 5 000 mg/kg tkun użata, allura t-test għandu jippreċedi għal 5 000 mg/kg fil-każ tar-riżultati B jew C fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat A sussegwenti ta' 5 000 mg/kg ikun jimponi studju ewlieni li jibda b'doża ta' 2 000 mg/kg u r-riżultati B u C ikunu jimponu studju ewlieni li jibda b'doża ta' 5 000 mg/kg.

▼B

Studju Ewlieni

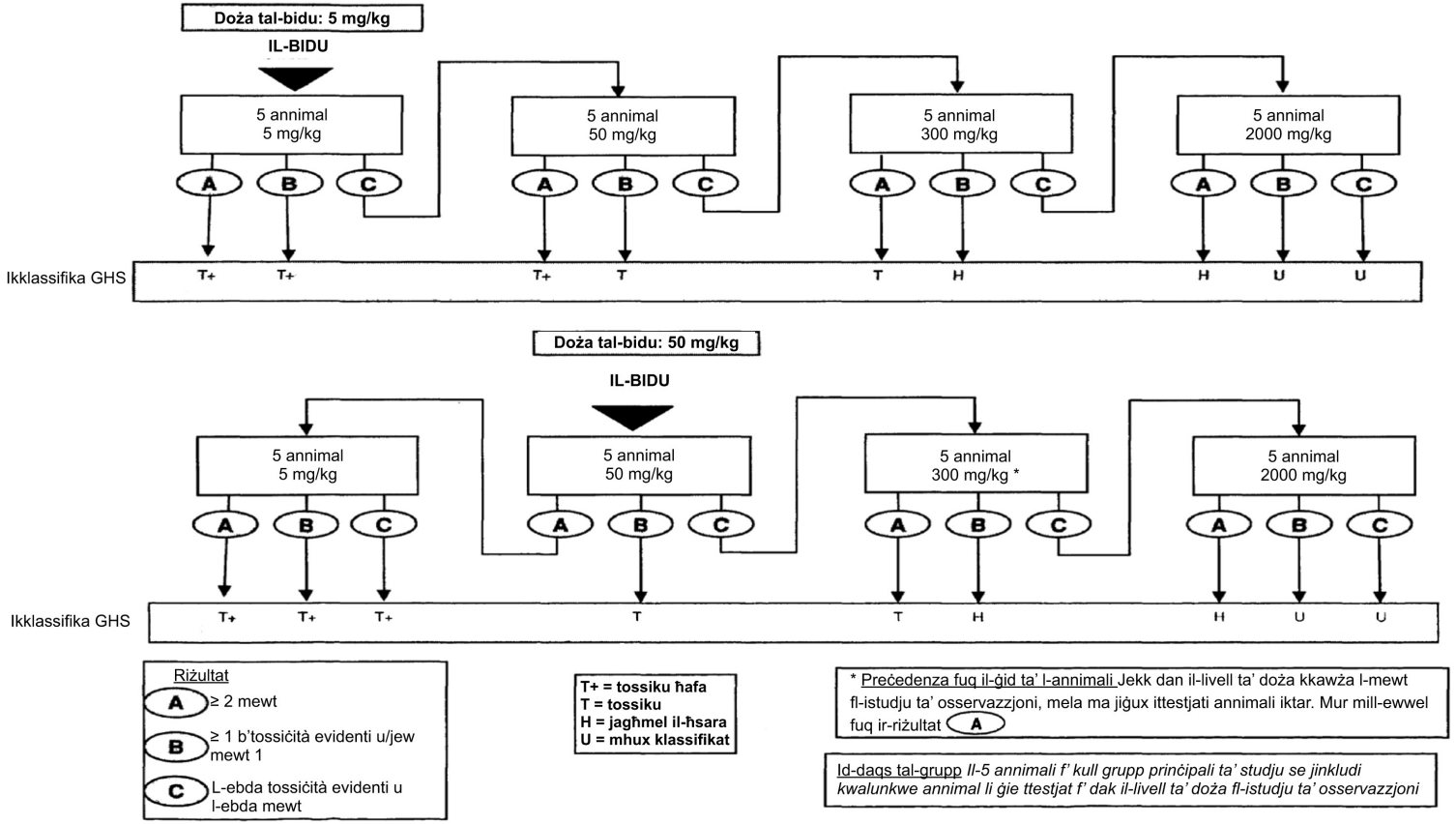
Ir-regoli tad-deċiżjoni li jirregolaw il-proċedura sekwenzjali ppreżentata fl-Anness 2 huma estiżi sabiex jinkludu l-livell ta' doża 5 000 mg/kg. Għalhekk, meta d-doża ta' l-istudju ewlieni li tibda bi 5 000 mg/kg tkun użata, ir-riżultat A (≥ 2 imwiet) ikun jeħtieġ it-testijiet tat-tieni grupp fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat B (tossiċità evidenti u/jew ≤ mewt 1)jew C (l-ebda tossiċità) ikun jirriżulta filli s-sustanza ma tkunx ikklassifikata skond il-GHS. L-istess, jekk id-doża tal-bidu apparti milli ta' 5 000 mg/kg tkun użata, allura t-test ikun jiproċedi lejn il-5 000 mg/kg fil-każ tar-riżultat C fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat A sussegwenti ta' 5 000 mg/kg ikun jirriżulta filli s-sustanza tkun assenjata għal GHS Kategorija 5 u r-riżultati B jew C ikunu jwasslu li s-sustanza ma tkunx ikklassifikata.

▼B

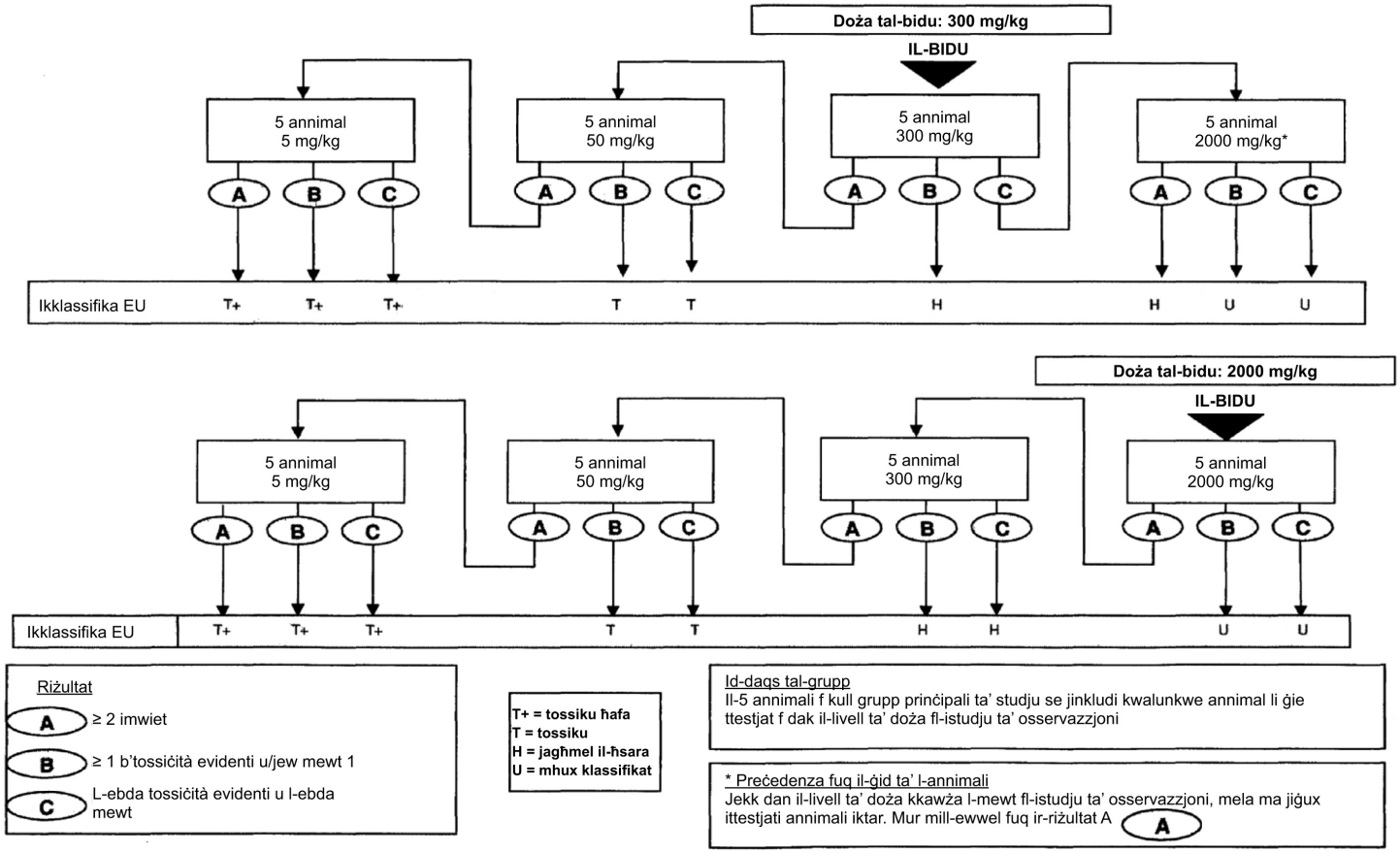
ANNESS 4

METODU TAT-TEST B.1.

bis Gwida dwar il-klassifika skond l-iskema UE li tkopri l-perjodu tranżitorju sat-tmiem sħiħ ta' l-implimentazzjoni kollha tas-Sistema Armonizzata tal-Klassifika Globali (GHS) (meħud mir-referenza (8))



▼B


Doża tal-bidu: 300 mg/kg
IL-BIDU
5 annimal 5 mg/kg
5 annimal 50 mg/kg
5 annimal 300 mg/kg
5 annimal 2000 mg/kg*
A B C
Ikklassifika EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Doża tal-bidu: 2000 mg/kg
IL-BIDU
5 annimal 5 mg/kg
5 annimal 50 mg/kg
5 annimal 300 mg/kg
5 annimal 2000 mg/kg
Ikklassifika EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Riżultat
A ≥ 2 imwiet
B ≥ 1 b'tossiċità evidenti u/jew mewt 1
C L-ebda tossiċità evidenti u l-ebda mewt
T+ = tossiku ħafa
T = tossiku
H = jagħmel il-ħsara
U = mhux klassifikat
Id-daqs tal-grupp
Il-5 annimali f kull grupp prinċipali ta' studju se jinkludi kwalunkwe annimal li ġie ttestjat f dak il-livell ta' doża fl-istudju ta' osservazzjoni
* Preċedenza fuq il-ġid ta' l-annimali
Jekk dan il-livell ta' doża kkawża l-mewt fl-istudju ta' osservazzjoni, mela ma jiġux ittestjati annimali iktar. Mur mill-ewwel fuq ir-riżultat A

▼B

B.1TRIS. **TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA – METODU TAL-KLASSIFIKA TOSSIKA AKUTA**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalnti għal OECD TG 423 (2001)

1.1. INTRODUZZJONI

Il-metodu tal-klassi tat-tossiċità akuta (1) kif stabbilit f'dan it-test huwa l-proċedura sussegwenti ma l-użu ta' 3 annimali ta' sess wieħed għal kull pass. Jiddependi mill-mortalità u/jew l-istat ta' modibondi li jkunu fih l-annimali, bħala medja 2-3 passi jkunu meħtieġa sabiex jippermeti li jsir ġudizju dwar it-tossiċità akuta tas-sustanza tat-test. Din il-proċedura hija riproduċibbli, tuża ftit annimali u hija kapaċi li tiggrada sustanzi b'manjera simili għall-metodi l-oħrajn tat-testijiet dwar it-tossiċità akuta. Il-metodu tal-klassi tat-tossiċità akuta huwa bbażat fuq evalwazzjonijiet biometriċi (2) (3) (4) (5) b'dożi fissi, separati b'mod adekwat sabiex jippermettu li sustanza tkun iggradata għall-iskopijiet tal-klassifika u ta' l-assessjar tal-periklu. Il-metodu kif adottat fil-1996 kien ġie validat b'mod estensiv *in vivo* bi tqabbil mad-dettalji JD_{50} akkwistati mil-letteratura, kemm nazzjonali (6) u dik internazzjonali (7).

Gwida dwar l-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq għal skop partikolari tista' tinstab fid-Dokument ta' Gwida dwat it-Testijiet tat-Tossiċità Orali Akuta (8). Dan id-Dokument ta' Gwida fih ukoll informazzjoni addizzjonali dwar it-twettieq u l-interpretazzjoni tal-metodu tat-test B. 1 tris.

Is-sustanzi tat-test, fid-dożi li huma magħrufa li jikkaġunaw uġiegħ qawwi u tbatija minħabba l-azzjonijiet korrossivi jew severament irritanti, ma jistgħux ikunu amministrati. Annimali fl-għafja tal-mewt, jew annimali avvjament bl-uġiegħ jew li juru sinjali ta' tbagħtija qawwija għandhom ikun u maqtula b'mod umanitarju, u huma meqjusa fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bl-istess mod bħal dawk l-annimali li jmutu matul it-test. Il-kriterja sabiex tittieħed id-deċiżjoni li jkunu maqtula l-annimali fl-għafja tal-mewt jew dawk li jkunu jbagħtu ħafna, u l-gwida dwar ir-rikonoxximent ta' mewt mistennija jew prevista, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida separat (9).

Dan il-metodu jutilizza dożi definiti bil-quddiem u r-riżultati jippermettu li sustanza tkun gradata u klassifikata skond is-Sistema Globali Armonizzata għall-klassifika ta' kimiċi li jikkaġunaw tossiċità akuta (10).

Bħala prinċipju, il-metodu mhux intiż li jippermetti l-kalkolu ta' LD_{50} preċiża, imma fil-fatt jipperemetti għad-determinazzjoni ta' medded ta' esposizzjoni definita meta l-letalità tkun mistennija minħabba li l-mewt ta' proporzjoni ta' l-annimali tkun xorta waħda l-għan finali ewlieni ta' dan it-test. Il-metodu jippermetti għad-determinazzjoni tal-valur LD_{50} biss meta mill-anqas żewġ dożi jirriżultaw f'mortalità għola minn 0 % u anqas minn 100 %. L-użu ta' għażla ta' dożi definiti bil-quddiem, independentament mis-sustanza tat-test, bil-klassifika espliċitament marbuta man-numri ta' l-annimali osservati f'diversi sitwazzjonijiet ittejjeb l-opportunità għar-rapurtaġġ ta' bejn laboratorju u laboratorju, b'konsistenza u repatabbilità.

▼B

Il-laboratorju tat-test għandu jikkonsidra l-informazzjoni disponibbli kollha dwar is-sustanza tat-test qabel ma jwettaq l-istudju. Tali informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza, il-propjetajiet fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultat ta' xi testijiet oħrajn *In vivo* jew *in vitro* dwar is-sustanza; id-dettalji tossikoloġiċi dwar is-sustanzi strutturament relatati; u l-użu antiċipat tas-sustanza. Din l-informazzjhoni hija meħtieġa sabiex tissodisfa lil dawk kollha ikkonċernati li t-test huwa relevanti għall-protezzjoni tas-saħħa umana u li jkun ta' għajnuna fl-għażla tad-doża tal-bidu l-aktar xierqa.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċità akuta orali: Tirreferi għal dawk l-effetti ħżiena li jseħħu wara l-amministrazzjoni orali ta' doża singola ta' sustanza jew ta' dożi multipli mogħtija matul 24 siegħa.

Mewt imdewma: Tfisser li annimal ma jmutx u ma jkunx jidher f'għafja tal-mewt fi żmien 48 siegħa imma li jmut aktar tard matul il-perjodu ta' l-osservazzjoni ta' 14-il jum.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test kif somministrata. Id-doża hija espressa bħala piż tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal ittestjat (eż. mg/kg).

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures. Is-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata għal Sustanzi u Taħlitiet Kimiċi. Attività konġunta tal-OECD (is-saħħa umana u l-ambjent), Il-Kumitat ta' Esperti tal-NU dwar it-Trasport ta' Oġġetti Perikoluži (il-propjetajiet fiżiċi/-kimiċi) u l-ILO (kommunikazzjoni perikoluża) u l-kordinazzjoni mill-Programm Interorganizzazzjonali għal Amministrazzjoni Soda tal-Kimika (IOMC).

Imwiet imminenti: Meta l-istat fl-għafja tal-mewt jew il-mewt ikunu mistennija qabel il-ħin ippjanat segwenti ta' l-osservazzjoni. Sinjali indikattivi għal dan l-istat f'annimali gerriema jistgħu jinkludu konvulżjonijiet, posizzjoni ta' serħan fuq il-ġemb, mitluqa fuq darhom, u tregħid (Ara d-Dokument ta' Gwida ta' l-Għan Finali b'mod Umanitarju (9) għal aktar dettalji).

LD_{50} (doża orali medja ta' l-mwiet): Hija doża akkwistata b'mod statistiku ta' sustanza li tista' tkun mistennija li tikkaġuna l-mewt fi 50 fil-mija ta' l-annimali meta amminsitrata bir-rotta orali. Il-valur LD_{50} huwa espress f'termini ta' piż tas-sustanza tat-test għal kull unità piż ta' l-annimal tat-test (mg/kg).

Doża b'limitu: Tirreferi għad-doża fil-limitu l-aktar għoli tat-testijiet (2 000 jew 5 000 mg/kg).

Stat moribund (fl-għafja tal-mewt): Huwa l-istat li jwassal għall-mewt jew ta' nuqqas ta' kapaċità għal ħajja, anki jekk ittrattat (ara d-Dokument ta' Gwida dwar it-Tmiem Finali b'mod Umanitarju (9) dwar aktar dettalji).

Mewt mistennija: Il-preżenza ta' sinjali kliniċi indikattivi tal-mewt fi żmien mistenni jew inkella fil-ġejjieni imma qabel it-tmiem ippjanat ta' l-esperiment, per eżempju: l-inabbiltà li jersaq lejn l-ilma u lejn l-ikel. (Ara d-Dokmunet ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (9) dwar aktar dettalji).

▼B

1.3. IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Huwa l-prinċipju tat-test li, ibbażat fuq il-proċedura ta' pass b'pass, bl-użu ta' numru minimu ta' annimali kull pass, informazzjoni suffiċjenti tkun akkwista dwar it-tossiċità akuta tas- sustanza tat-test sabiex tiffaċilita l-klassifika tagħha. Is-sustanza hija amministrata b'mod orali fuq grupp ta' annimali esperimentali b'waħda mid-dożi definiti. Is-sustanza hija ittestjata bl-użu tal-proċedura tal-pass b'pass, kull pass jutilizza tlett annimali ta' sess wieħed (normalment nisa). In-nuqqas jew il-preżenza ta' mortalità relatata mal-kompost ta' l-anniamli bid-doża. Ta' l-ewwel pass tkun tiddetermina l-pass segwenti, i.e.:

— l-ebda aktar testijiet ma jkunu meħtieġa,

— id-doża fuq tlett annimali, bl-istess doża,

— id-doża fuq tlett annimali addizzjonali fil-livell aktar għoli segwenti jew fil-livell aktar baxx preċedenti.

Id-dettalji tal-proċedura tat-test huma deskritti fl-Anness I. Il-metodu ikun jiffaċilita ġudizju fir-rigward tal-klassifika ta' sustanza tat-test lejn waħda mis-serje tal-klassijiet ta' tossiċità definiti bil-valuri fissi LD-50 bħala waqfien.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.4.1. **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

L-ispeċi preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċi oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Normalment ikunu wżata il-femminili (9). Dan huwa minħabba li listħarriġ letterarju tat-testijiet konvenzjonali LD-50 juru li normalment ikun hemm ftit differenza fis-sensittività bejn is-sessi, imma li f'dawk il-każi meta d-differenzi jkunu osservati, in-nisa ikunu ġeneralment kemm xejn aktar sensittivi (11). B'dana kollu, jekk tagħrif dwar il-propjetajiet tossikoloġiċi jew tossikinetiċi ta' kimiċi strutturament relatati jindika li l-irġiel aktarx li jkunu aktar sensittivi, allura dak is-sess għandu jkun użat. Meta t-test ikun imwettaq fuq maskili, ġustifikazzjoni adekwata għandha tkun ipprovduta.

Annimali żgħażagħ adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Kull annimal, fil-bidu ta' meta jkun sejjer jingħata doża, għandu jkun f'età ta' bejn 8 u 12 il-ġimgħa u l-piż tiegħu għandu jkun fil-medda ta' ± 20 % tal-piż medju ta' dawk l-annimali li preċedentament ikun u ntużaw għad-dożi.

1.4.2. **Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-annimali jistgħu ikunu miġbura flimkien bħala grupp skond id-doża, imma n-numru ta' l-annimali f'kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjonijiet ċari ta' kull annimal.

▼B

1.4.3. **Preparazzjoni ta' l-annimali**

L-annimali għandhom ikunu magħżula kif jinzerta, immarkati sabiex jippermettu identifikazzjoni individwali, u miżmuma fil-gaġġeġ tagħhom għal mil anqas 5 tijiem qabel il-bidu tad-doża sabiex jippermettu li jkunu akklamattiżati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

1.4.4. **Preparazzjoni tad-doża**

Ġeneralment, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu amministrati f'volum kostanti matul medda ta' doża tat-testijiet bil-varjazzjoni tal-konċentrazzjoni fil-preparazzjoni tad-doża. Meta, b'dana kollu, likwidu jew taħlita ikunu l-prodott finali, l-użu ta' sustanza tat-test mingħajr trattib, i.e. konċentrazzjoni kostanti, tista' tkun aktar relevanti għall-istudju sussegwenti tar-riskju ta' dik is-sustanza, u hija ħtieġa għal uħud mill-awtoritajiet regolatorji. Fi kwalunkwe każ, il-volum massimu tad-doża għall-amminsitrazzjoni m'għandux ikunu misbuq. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Fl-annimali gerriema, il-volum m'għandux normalment jeċċedi 1ml/100g tal-piż tal-ġisem: b'dana kollu fil-każ ta' taħlitiet akweji, 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jkun ikkonsidrat. Fir- rigward tal-formulazzjoni tal-preparazzjoni tad-doża, l-użu ta' taħlita/sospenzjoni/emulsifikazzjoni akweja hija rakkommandata kull meta possibbli, segwita f'ordni ta' preferenza bit-taħlita/sospenzjoni/emulsifikazzjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħ-ir- rum) u mbagħad il-possibbiltà ta' likwidi oħrajn. Għal likwidi oħrajn apparti milli l-ilma, il-karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. Id-dożi għandhom ikunu ppreparati ftit qabel l-amministrazzjoni, sakemm l-istabbiltà tal-preparazzjoni matul il- perjodu ta' l-użu tkun magħrufa u turi li tkun aċċettabbli.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Amministrazzjoni tad-doża**

Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doża waħda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi intubazzjoni canula xierqa. F'ċirkostanzi mhux tas-soltu li fihom doża waħda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix l-24 siegħa.

L-annimali għandhom ikunu msajma qabel ma jingħataw id-doża (eż. għall-firien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul il-lejl sal-ħin ta' l-esperiment; fil-każ ta' ġurdien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul 3-4 siegħat). Wara l-perjodu tas-sawma, l-annimali għandhom ikunu miżuna u s-sustanza tat-test tkun somministrata. Wara li s-sustanza tat-test tkun somministrata, l-ikel jista' jkun imċaħħad għal 3-4 siegħat oħra fil-każ tal-firien jew 1-2 siegħat fil-każ tal-ġrieden. Meta d-doża tkun somministrata fi frazzjonijiet matul perjodu ta' żmien, jista' jkun meħtieġ li l-annimali jkunu ipprovduti b'ikel u ilma, jiddependi mit-tul tal-perjodu.

1.5.2. **Numru ta' l-annimali u l-livelli tad-doża**

Tlett annimali huma użati għal kull pass. Il-livell tad-doża li għandu jkun użat bħala d-doża tal-bidu jkun magħżul minn wieħed minn erba' livelli fissi, 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg piż tal-ġisem. Il-livell tad-doża tal-bidu għandu jkun dak li jkun l-aktar probabbli li jipproduċi mortalità f'uħud mill-animali li jkunu reċevew id-doża. Il-karti tan-nixxija ta' l-Anness 1 jiddeskrivu l-proċedura li għandha tkun segwita għal kull waħda mid-dożi tal-bidu. B'żieda, l-Anness 4 jagħti gwida dwar il-klassifika fis-sistema UE sakemm GHS ġdida tkun implementata.

▼B

Meta l-informazzjoni disponibbli tissuġġerixxi li l-lortalità pjuttost li ma sseħħx fl-għola livell tal-bidu (2 000 mg/kg piż tal-ġisem), allura test tal-limitu għandu jkun imwettaq. Meta ma jkunx hemm informazzjoni dwar xi sustanza li għandha tkun ittestjata, għal raġunijiet tal-ġid ta' l-annimali, huwa rakkommandabbli li jsir użu minn doża tal-bidu ta' 300 mg/kg piż tal-ġisem.

L-intervall tal-ħin bejn id-dożi f'kull wieħed mill-livelli huwa determinat bl-iskoppjar, it-tul, u s-severità, tas-sinjali tossiċi. It-trattament ta' l-annimali fid-doża segwenti għandu jkun imdewwem sakemm wieħed ikun żgur bis-sopravivenza ta' l-annimali li jkunu ireċevew id-doża preċedentament.

B'mod eċċezzjonali, u biss meta iġġustifikat bi ħtiġiet regolatorji speċifiċi, l-użu ta' doża addizzjonali iffissata fil-livel għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkonsidrata (ara l-Anness 2). Għal raġunijiet li jikkonċernaw il-ġid ta' l-annimali, it-testijiet ta' l-annimali skond GHS, il-Kategorija 5, il-meded (2 000-5 000 mg/kg huma ferm skorraġiti u għandhom biss ikunu ikkonsidrati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu relevanza diretta għall-rotezzjoni umana jew tas-saħħa ta' l-annimali jew dik ambjentali.

1.5.3. **Test tal-limitu**

It-test tal-limitu huwa primarjament użat f'sitwazzjonijiet meta dak li jwettaq l-esperiment ikollu informazzjoni li tindika li l-materjal tat-test ma jkunx tossiku, i.e. li jkollu tossiċita biss aktar mil-limitu regolatorju tad-doži. L-informazzjoni dwar it-tossiċità tal-materjal tat-test tista' tkun akkwistat mit-tagħrif dwar komposti simili li kienu ġew ittestjati jew minn taħlitiet jew prodotti simili li kienu ġew ittestjati, billi tkun meqjusa l-identità u l-persentaġġ tal-komponenti magħrufa li huma ta' sinifikanza tossikoloġika. F'dawk is-sitwazzjonijiet meta jkun ftit jew l-ebda informazzjoni dwar. It-tossiċità tagħha, jew li fiha l-materjal tat-test ikun mistenni li jirriżulta tossiku, it-test ewlieni għandu jkun imwettaq.

Test tal-limitu f'doża waħda fil-livell ta' 2 000 mg/kg piż tal-ġisem jista' jitwettaq fuq sitt annimali (tlett annimali kull pass). B'mod eċċezzjonali, test tal-limitu b'doża waħda fil-livell ta' 5 000 mg/kg jista' jkun imwettaq fuq tlett annimali (ara l-Anness 2). Jekk il-mortalità tat-test relatata mas-sustanza tirriżulta, aktar testijiet fil-livell preċedenti aktar baxx jista' jkun hemm il-ħtieġa li jitwettqu.

1.6. OSSERVAZZJONIJIET

L-annimali osservati individwalment wara l-ewwel doża mill-anqas darba matul l-ewwel 30 minuta, perjodikament matul l-ewwel 24 siegħa, b'attenzjoni speċjali mogħtija matul l-ewwel 4 siegħat, u ta' kull minn hemm il-quddiem, għal total ta' 14-il jum, apparti minn meta jkun meħtieġ li dawn jitneħħew mill-istudju u li jkunu maqtula b'mod umanesk għal raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali jew inkella li jinsabu mejta. B'dana kollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandhux ikun iffissat b'mod rigoruż. Għandu jkun determinat bir-reazzjoni tossika, il-ħilata' l-iskoppjar u t-tul tal-perjodu ta' l-irkupru, u jista' b'hekk ikun estiż meta ikkonsidrat bħala meħtieġ. Il-ħinijiet li fihom is-sinjali tat-tassiċità) jkunu apparaenti jew li jisparixxu huma. Importanti, speċjalment meta jkun hemm tendenza li s-sinjali tossiċi jkunu mdewma (12). L-osservazzjonijiet kollha huma sistematista'ment irreġistrati, b'dettalji individwali jkunu jinżammu għal kull annimal.

▼B

Osservazzjonijiet addizzjonali jkunu meħtieġa jekk l-annimali jkomplu juru sinjali ta' tossiċità. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu xi tibdil fil-ġilda u s-suf, l-għajnejn, fil-membrani mukaneji, u wkoll fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċi u tan-nervituri ċentrali, u l-attività somatomuturali u t-tip ta' l-imġieba. Attenzjoni għandha tkun diretta għall-osservazzjonijiet ta' roda, konvulżjonijiet, rieq, dijarrea, letarġija, irqad u koma. Il-prinċipji u l-kriterja kif aggruppati fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Miri Umanitarji għandhom ikunu ikkonsidrati (9). L-annimali misjuba f'kundizzjoni moribonda u l-annimali li juru sinjali ta' uġieħ qawwi jew li jgħaddu minn sinjali ta' tbgħatija, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju. Meta l-annimali jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji jew jekk jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jkun reġistrat bi preċiżjoni kemm jista' jkun possibbli.

1.6.1. **Piż tal-ġisem**

Il-piżijiet ta' l-annimali individwali għandhom ikunu determinati kemxejn qabel ma s-sustanza tat-test tkun somministrata u mill-anqas darba fil-ġimgħa wara dan. Tibdiliet fil-piż għandhom ikunu ikkalkolati u rreġistrati. Fit-tmiem tat-test, l-annimali li jibqgħu ħajjin għandhom ikunu miżuna w imbagħas maqtula b'mod umanitarju.

1.6.2. **Patoloġija**

L-annimali kolha tat-test (inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jkunu mneħħija mill-istudju minħabba raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali għandhom ikunu suġġetti għal nekropsija ġenerali. It-tibdiliet patoloġiċi ġenerali għandhom ikunu irreġistrati għal kull annimal. Eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi li juri evidenza patoloġika ġenerali fl-annimali li jibqgħu ħajjin għa 24 siegħa jew aktar wara li jkunu rċevew id-doża inizjali għandha wkoll tkun ikkunsidrata minħabba li din tista' tforni informazzjoni utili.

2. **DATA**

Data ta' l-annimal individwali għandha tkun ipprovduta. B'żieda ma dan, id-dettalji kollha għandhom ikunu miġbura f'sommarju, li juru għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali użati, in-numru ta' annimali ji jkollhom sinjali ta' tossiċità, in-numru ta' annimali li jinstabu mejta matul it-test jew li jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin tal-mewt ta' l-annimali individwali, deskrizzjoni u l-korsa tal-ħin ta' l-effetti tossiċi, u r-riversabbiltà ta' dawn, u s-sejbiet tan-nekropsija.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. **Rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skond kif xieraq:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika, il-purità, u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi (inkluża l- iżomerizzazzjoni);

— dettalji ta' l-identifikazzjoni, inkluż in-numru CAS.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

— speċi/tipi użati;

▼B

— l-istatus mikrobioloġiku ta' l-annimali, meta magħruf;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali (inklużi, meta xieraq, raġornament dwar l-użu ta' maskili minflok femminili);

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc.

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi dettalji dwar l-għamla fiżika tal-materjal amministrat;

— dettalji dwar l-amminstrazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi l-volumi tad-doži u l-ħin ta' meta tkun ingħata d-doża;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma (inklużi t-tip/sorsi tad-dieta, is-sorsi ta' l-ilma);

— ir-raġjonar għall-għażla tad-doża tal-bidu.

Riżultati:

— tabulazzjoni tad-dettalji tar-reazzjoni u tal-livell tad-doża għal kull animal (i.e. l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi l-effetti tal-mortalità, in-natura, is-severanza u t-tul ta' l-effetti);

— tabulazzjoni tal-piż tal-ġisem u tat-tibdiliet fil-piż tal-ġisem;

— il-piżijiet ta' l-annimali individwali fil-jum ma meta jirċievi d-doża, u wara dan matul intervalli ta' darba fil-ġimgħa, u l-ħin tal-mewt jew ta' meta jkunu maqtula;

— id-data u l-ħin tal-mewt jekk qabel il-qtil previst;

— il-korsa tal-ħin ta' kif jiskoppjaw is-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kienux riversibbli għal kull animal individwali;

— is-sejbiet tan-nekropsija u s-sejbiet ħispatoloġiċi għal kull animal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 (http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html).

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

ANNESS 1

PROĊEDURA LI GĦANDHA TKUN SEGWITA GĦAL KULL WAĦDA MID-DOŻI TAL-BIDU

RIMARKI ĠENERALI

Għal kull doża tal-bidu, l-iskemi rispettivi tat-testijiet, kif inklużi f'dan l-Anness, jelenkaw il-proċedura li għandha tkun segwita.

— Anness 1 a: Id-doża tal-bidu hija: 5 mg/kg piż tal-ġisem

— Anness 1 b: Id-doża tal-bidu hija: 50 mg/kg piż tal-ġisem

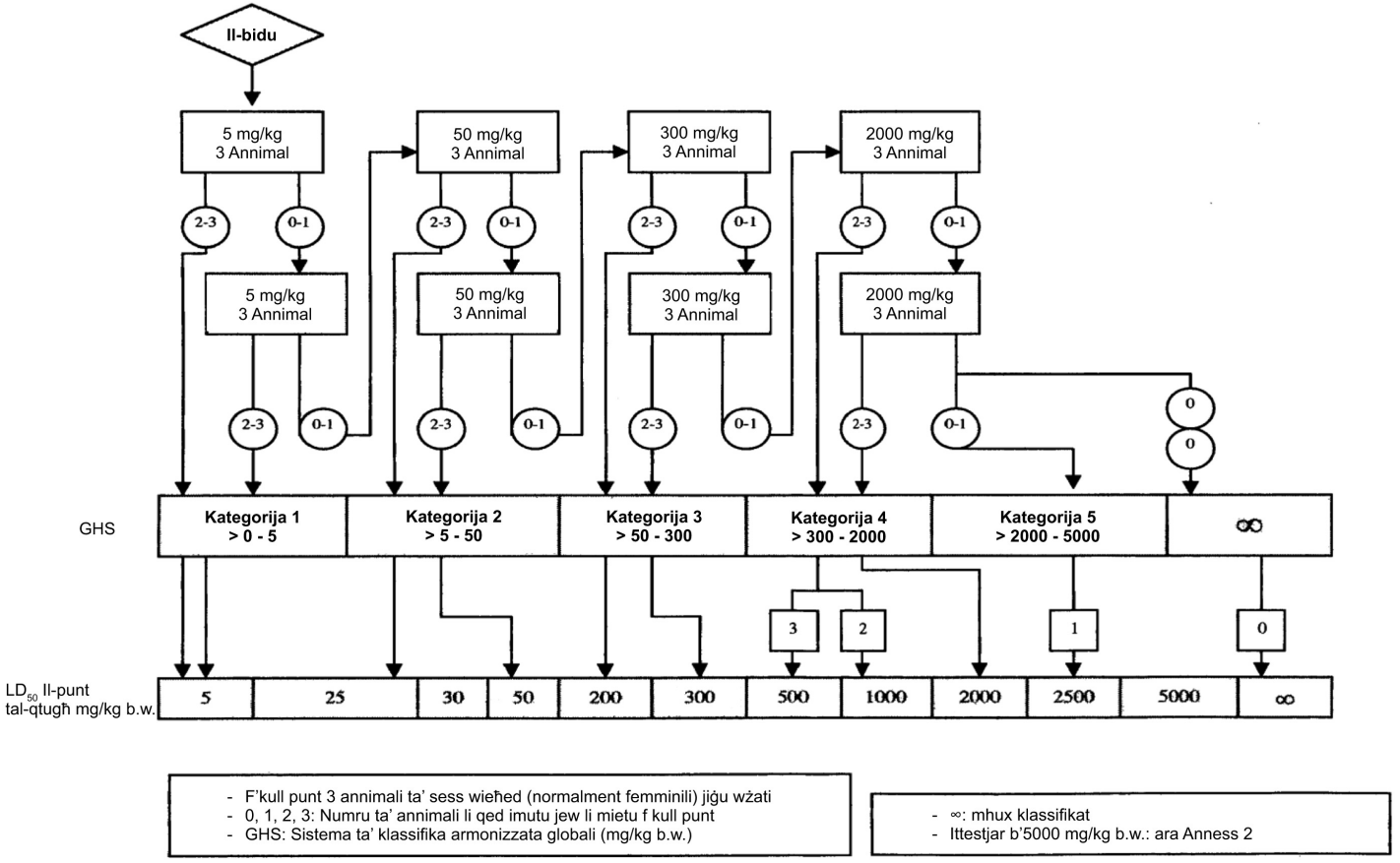
— Anness 1 c: Id-doża tal-bidu hija: 300 mg/kg piż tal-ġisem

— Anness 1 d: Id-doża tal-bidu hija: 2 000 mg/kg piż tal-ġisem

Jiddependi min-numru ta' annimali maqtula b'mod umanitarju jew ta' l-annimali mejta, il-proċedura tat-test għandha ssegwi il-vleġeġ indikati.

ANNESS 1A

PROĊEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 5 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



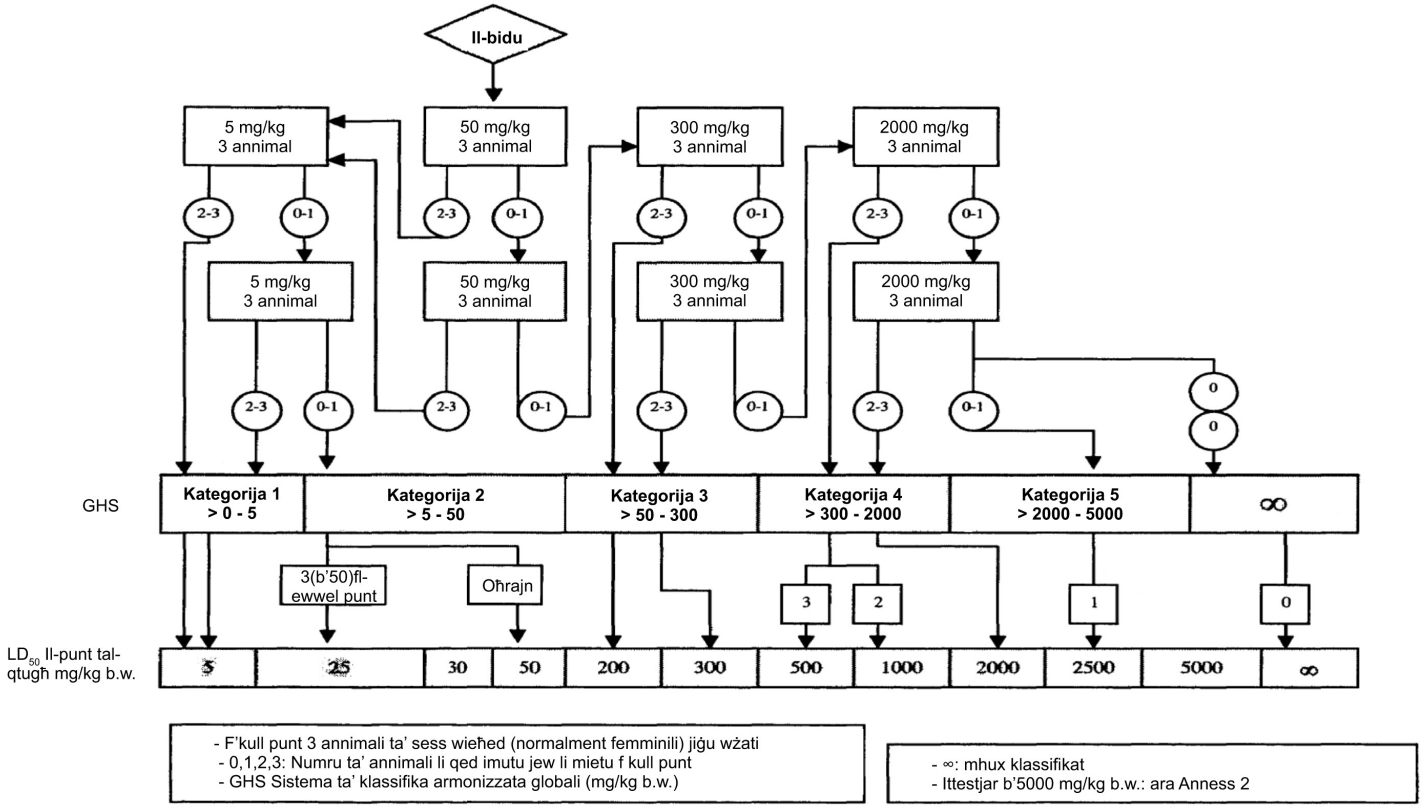
- F'kull punt 3 annimali ta' sess wieħed (normalment femminili) jiġu wżati
- 0, 1, 2, 3: Numru ta' annimali li qed imutu jew li mietu f kull punt
- GHS: Sistema ta' klassifika armonizzata globali (mg/kg b.w.)

- ∞: mhux klassifikat
- Ittestjar b'5000 mg/kg b.w.: ara Anness 2

02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 226

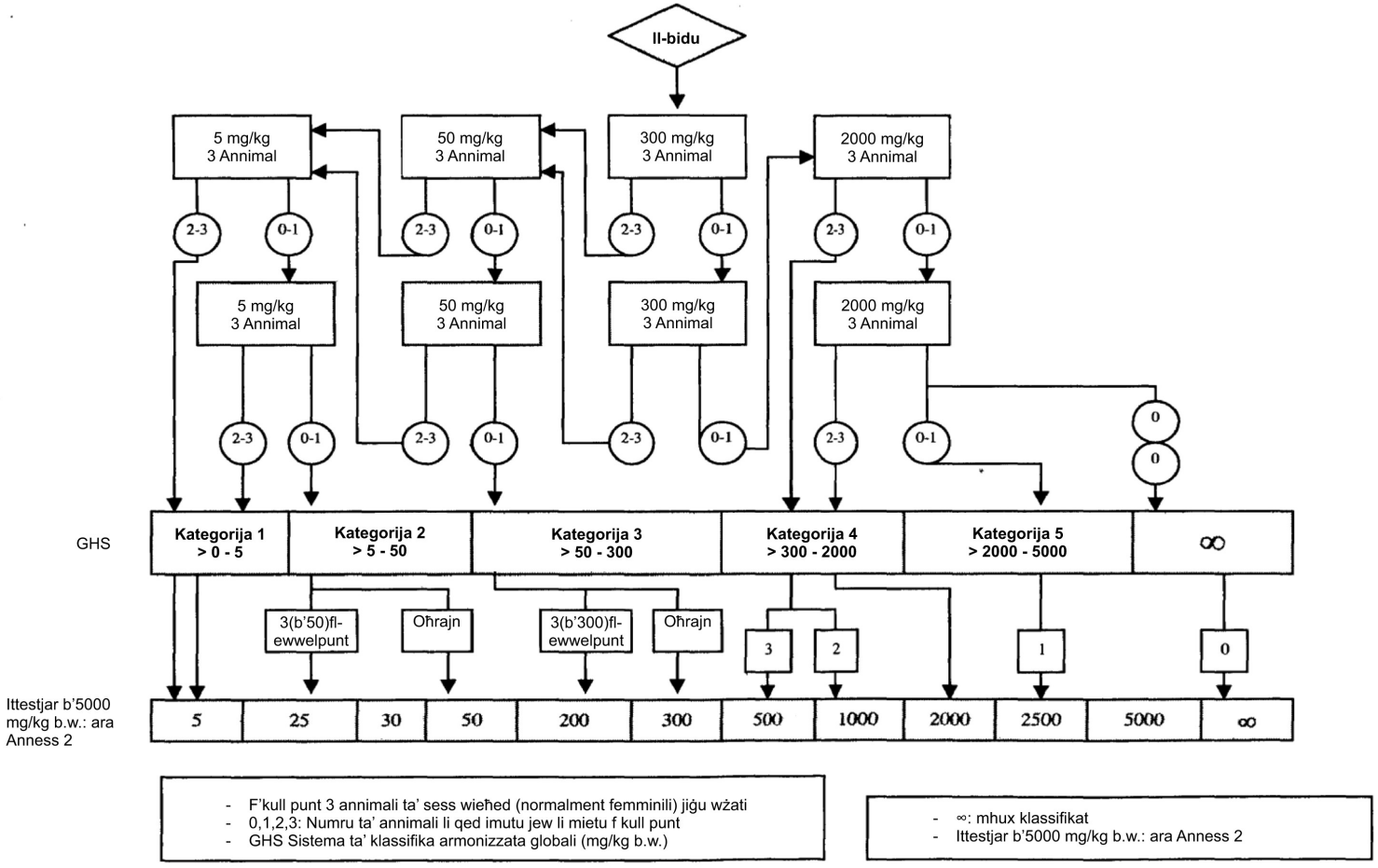
ANNESS 1B

PROĊEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 50 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



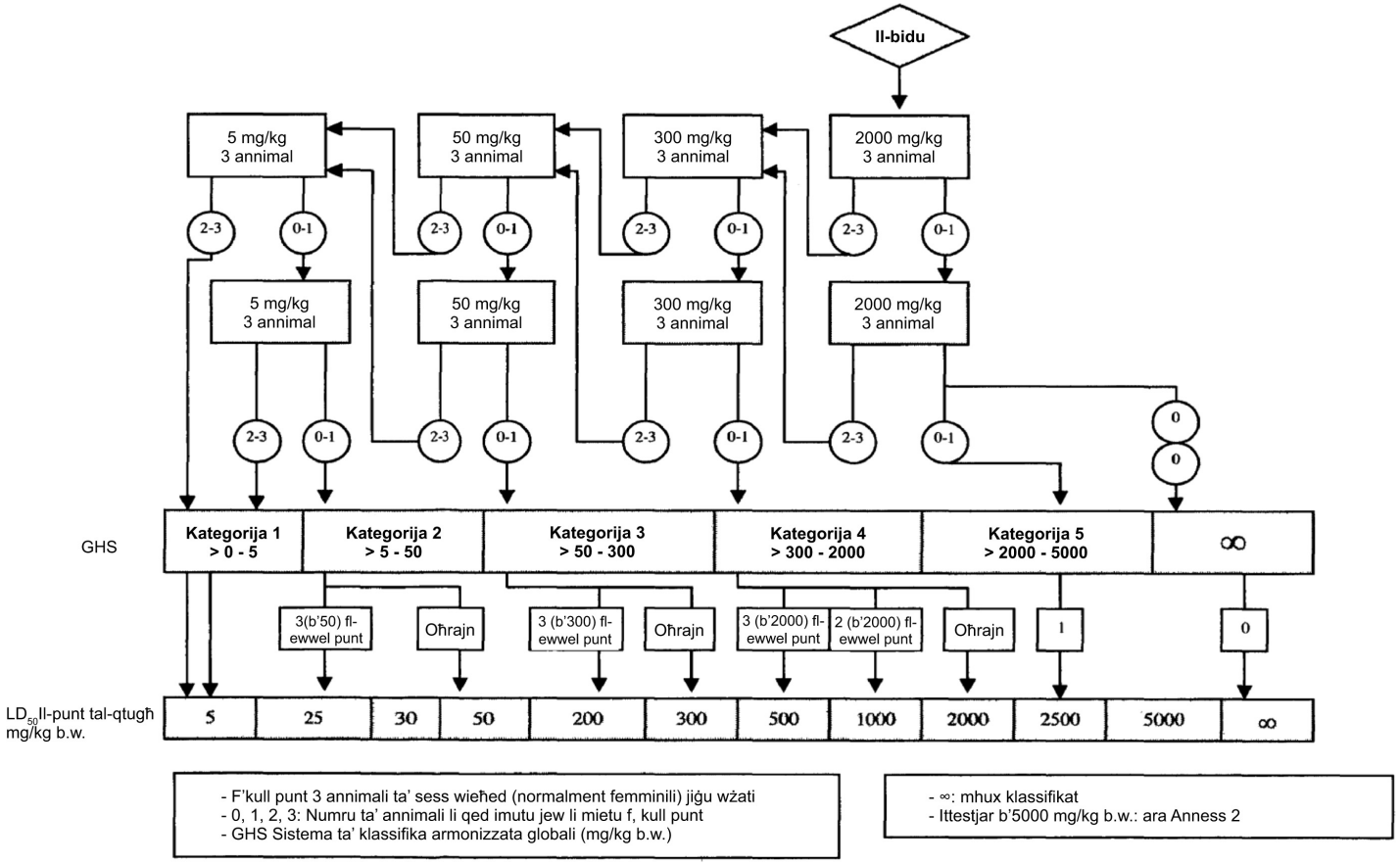
ANNESS 1C

PROĊEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 300 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



ANNESS ID

PROĊEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 2 000 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



▼B

ANNESS 2

KRITERJA GĦALL-KLASSIFIKA TAS-SUSTANZI TAT-TEST B'VALURI MISTENNIJA TA' LD_{50} LI JEĊĊEDU 2 000 MG/KG MINGĦAJR IL-ĦTIEĠA TA'TESTIJIET

Il-kriterji dwar il-periklu tal-Kategorija 5 hija ntiża sabiex tiffaċilita l-identifikazzjoni tas-sustanzi tat-test li huma relattivament f'periklu ta' tossiċità akuta baxxa imma li, skond ċerti ċirkostanzi jistgħu jippreżentaw periklu għall-populazzjonijiet vulnerabbli. Dawn is-sustanzi huma antiċipati li jkollhom LD_{50} orali jew tal-ġilda fil-medda ta' 2 000 - 5 000 mg/kg jew b'doża ekwivalenti għal rotot oħrajn. Is-sustanzi tat-test jistgħu ikunu klassifikati fil-kategorija tal-periklu definita bi: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (Kategorija 5 fil-GHS) f'dawn il-każi li ġejjin:

a) jekk ikunu miġjuba f'din il-kategorija minn kwalunkwe skemi tat-testijiet ta' l-Anness 2, ibbażati fuq l-inċidenti tal-mortalità;

b) jekk evidenza affidabbli diġà tkun disponibbli li tindika li l-LD_{50} tkun fil-medda tal-valuri tal-Kategorija 5; jew li studji oħrajn dwar l-annimali jew ta' l-effetti tossiċi fil-bnedmin umani jindikaw tħassib għas-saħħa umana ta' natura akuta;

c) permezz ta' extrapolazzjoni, estimi jew kejl tad-dettalji jekk assenjati għal klassi aktar perikoluża milli mistħoqq; u

— informazzjoni affidabbli kif disponibbli tindika effetti tossiċi sinifikati fil-bnedmin, jew

— xi mortalità tkun osservata meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4 bir-rotta orali, jew

— meta ġudizzju minn esperti jikkonferma sinjali kliniċi sinifikanti ta' tossiċità, meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4, apparti milli għal dijarrea, piloerezzjoni jew dehra żmattata, jew

— meta ġudizzju minn esperti jikkonferma li l-informazzjoni affidabbli tindika l-potenzjal għal effetti sinifikament akuti minn studji oħrajn fuq l-annimali.

TESTIJIET F'DOŻI OGĦLA MINN 2 000 MG/KG

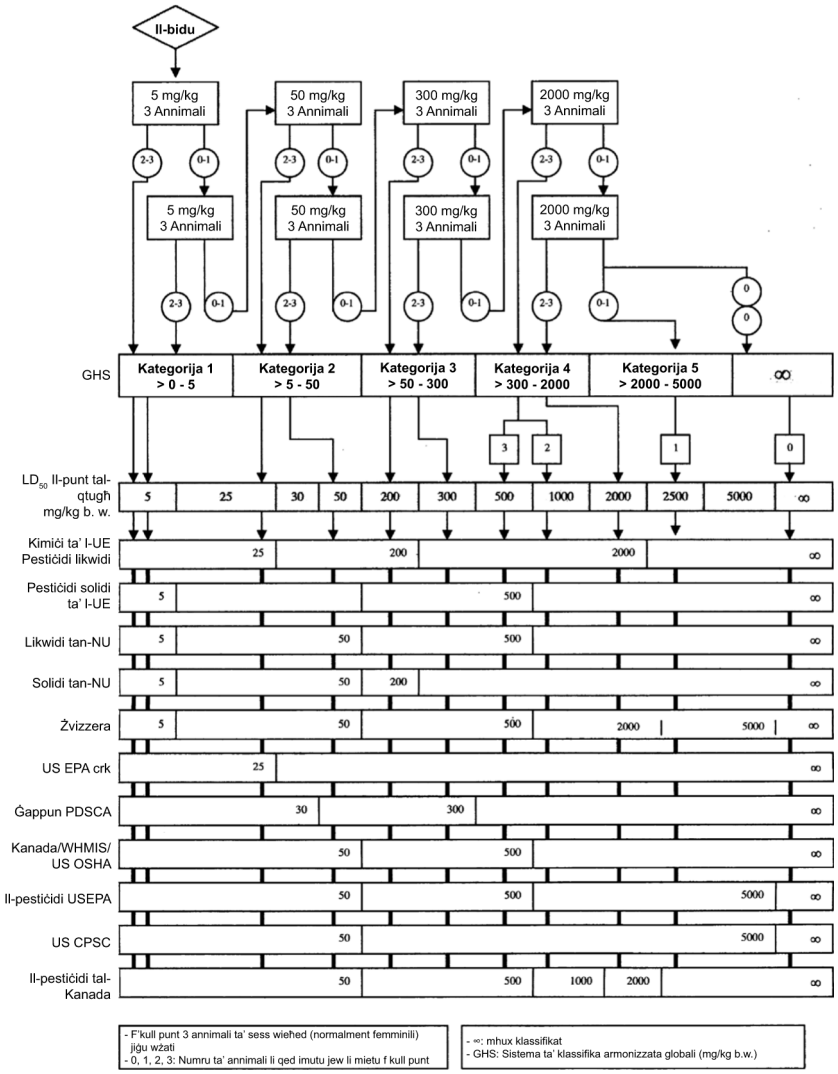
Bir-rikonoxximent tal-ħtieġa li jkun imħares il-ġid ta' l-annimali, testijiet fi 5 000 mg/kg huma skurraġiti u għandhom biss ikunu kkunsidrati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn test bħal dan ikollu relevanza diretta għall protezzjoni tas-saħħa ta' l-annimali jew dik umana (10). L-ebda aktar testijiet m'għandhom ikunu mwettqa fil-livelli tad-doża aktar għoljin.

Meta t-testijiet ikunu jeħtieġu doża ta' 5 000 mg/kg, il-pass wieħed biss (i.e. tliet annimali) huwa meħtieġ. Jekk l-ewwel annimal li jkun ingħata d-doża, imut, allura l-għoti tad-doża għandu jipproċedi fi 2 000 mg/kg skond il-*flow chart* fl-Anness 1. Jekk l-ewwel annimal jibqa' ħaj, żewġ annimali oħrajn għandhom jingħataw id-doża. Jekk wieħed biss mit-tliet annimali jmut, il-valur LD_{50} huwa mistenni li jeċċedi 5 000 mg/kg. Jekk żewġ annimali jmut, allura d-doża tipproċedi fi 2 000 mg/kg.

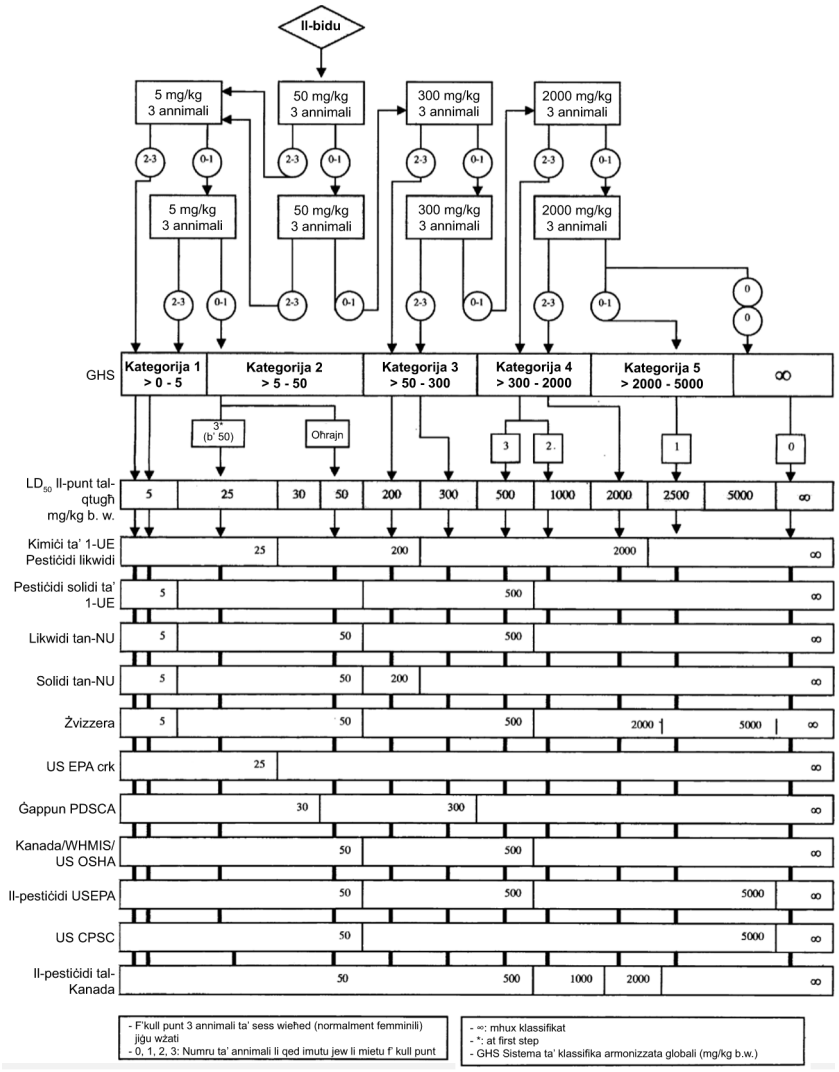
▼B

ANNESS 3

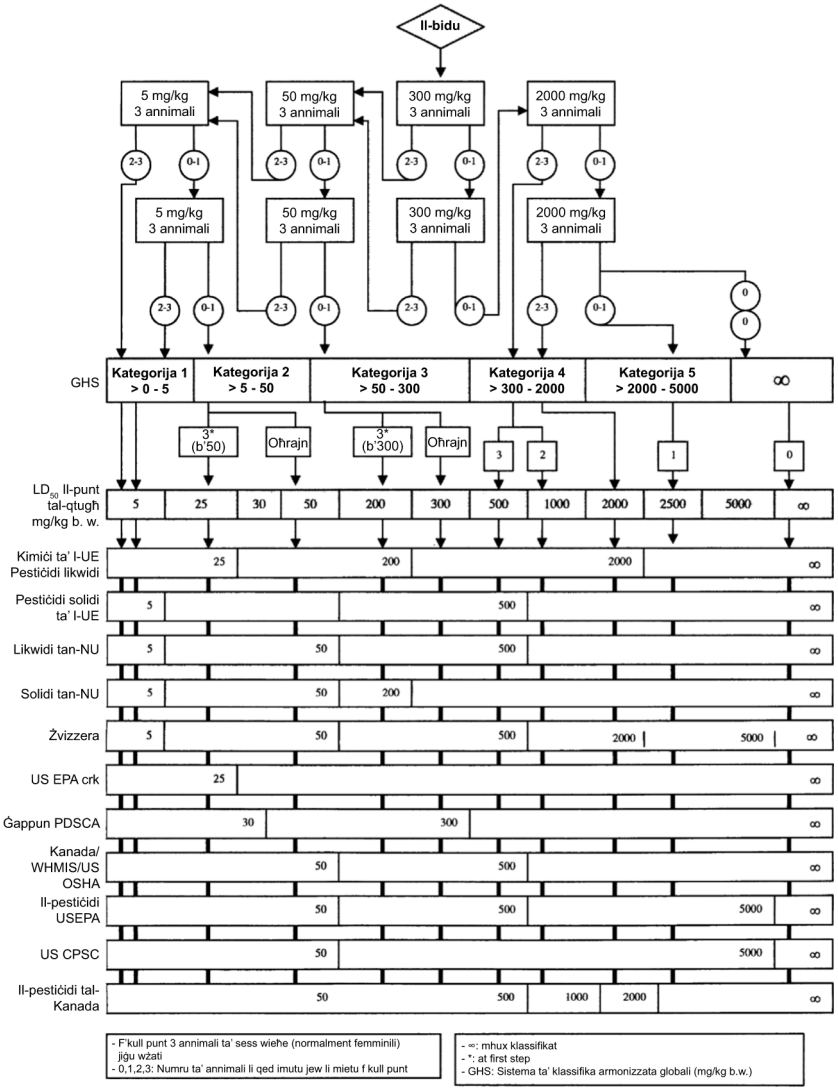
B1c. METODU TAT-TEST Gwida dwar il-klassifika skond l-iskema UE li tkopri l-perjodu transitorju sakemm ikun hemm l-implementazzjoni sħiħa tas-Sistema ta' Klassifika Armonizzata Globali (GHS) (meħuda minn referenza (8))



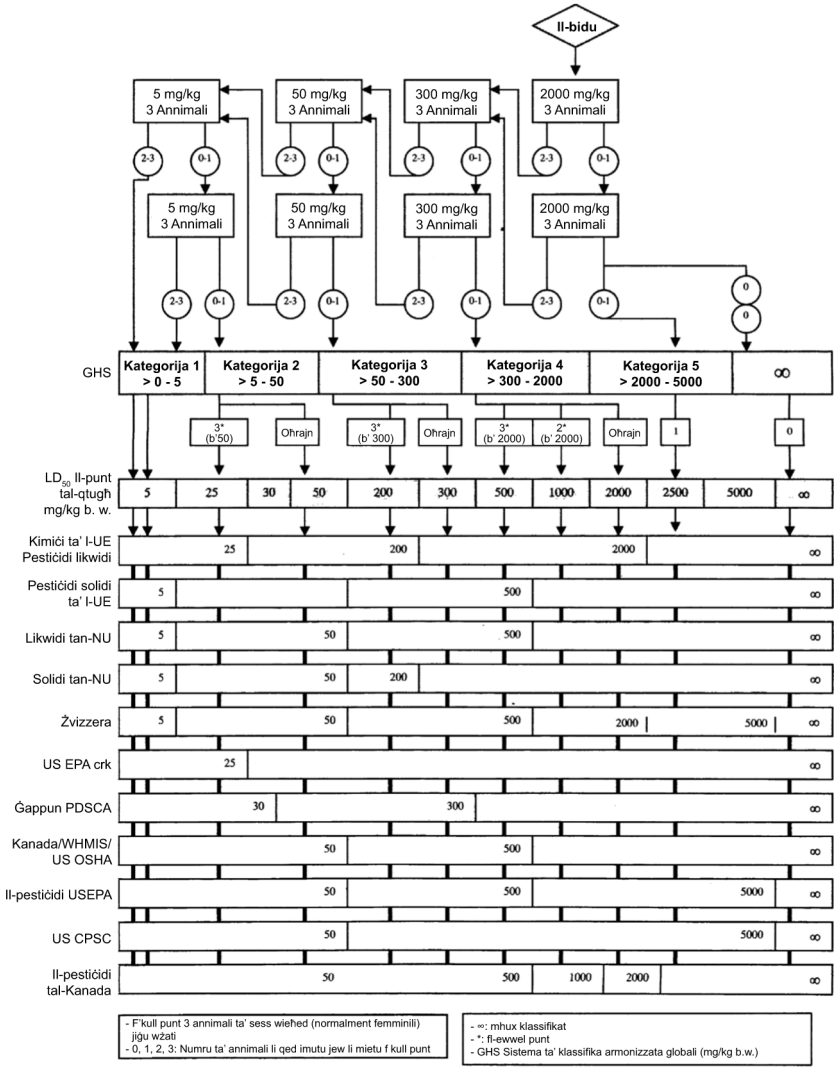
▼B


Il-bidu
5 mg/kg 3 annimali
50 mg/kg 3 annimali
300 mg/kg 3 annimali
2000 mg/kg 3 annimali
5 mg/kg 3 annimali
50 mg/kg 3 annimali
300 mg/kg 3 annimali
2000 mg/kg 3 annimali
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (b' 50)
Ohrajn
LD50 Il-punt tal-qtugħ mg/kg b. w.
Kimiċi ta' 1-UE Pestiċidi likwidi
Pestiċidi solidi ta' 1-UE
Likwidi tan-NU
Solidi tan-NU
Żvizzera
US EPA crk
Ġappun PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
Il-pestiċidi USEPA
US CPSC
Il-pestiċidi tal-Kanada
- F'kull punt 3 annimali ta' sess wieħed (normalment femminili) jiġu wżati
- 0, 1, 2, 3: Numru ta' annimali li qed imutu jew li mietu f' kull punt
- ∞: mhux klassifikat
- *: at first step
- GHS Sistema ta' klassifika armonizzata globali (mg/kg b.w.)

▼B


Il-bidu
5 mg/kg 3 annimali
50 mg/kg 3 annimali
300 mg/kg 3 annimali
2000 mg/kg 3 annimali
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (b'50)
Ohrajn
3* (b'300)
LD50 Il-punt tal-qtugħ mg/kg b. w.
Kimiċi ta' l-UE Pestiċidi likwidi
Pestiċidi solidi ta' l-UE
Likwidi tan-NU
Solidi tan-NU
Żvizzera
US EPA crk
Ġappun PDSCA
Kanada/ WHMIS/US OSHA
Il-pestiċidi USEPA
US CPSC
Il-pestiċidi tal-Kanada
- F'kull punt 3 annimali ta' sess wieħe (normalment femminili) jiġu wżati
- 0,1,2,3: Numru ta' annimali li qed imutu jew li mietu f kull punt
- ∞: mhux klassifikat
- *: at first step
- GHS: Sistema ta' klassifika armonizzata globali (mg/kg b.w.)

▼B


Il-bidu
5 mg/kg 3 Annimali
50 mg/kg 3 Annimali
300 mg/kg 3 Annimali
2000 mg/kg 3 Annimali
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (b˙50)
Ohrajn
3* (b˙300)
3* (b˙2000)
2* (b˙2000)
1
LD50 Il-punt tal-qtugħ mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
Kimiċi ta' l-UE Pestiċidi likwidi
Pestiċidi solidi ta' l-UE
Likwidi tan-NU
Solidi tan-NU
Żvizzera
US EPA crk
Ġappun PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
Il-pestiċidi USEPA
US CPSC
Il-pestiċidi tal-Kanada
- F'kull punt 3 annimali ta' sess wieħed (normalment femminili) jiġu wżati
- 0, 1, 2, 3: Numru ta' annimali li qed imutu jew li mietu f kull punt
- ∞: mhux klassifikat
- *: fl-ewwel punt
- GHS Sistema ta' klassifika armonizzata globali (mg/kg b.w.)

▼M4

B.2. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test 403 (2009) tal-OECD (1). Il-Linja Gwida 403 (TG 403) tat-Test oriġinali dwar l-inalazzjoni akuta kienet adottata fl-1981. Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.2 rivedut (bħala ekwivalenti għat-TG 403 riveduta) tfassal biex ikun aktar flessibbli, biex inaqqas l-użu tal-annimali, u biex jissodisfa ħtiġijiet regolatorji. Il-Metodu ta' Ttestjar rivedut fih żewġ tipi ta' studji: protokoll Tradizzjonali LC_{50} u protokoll ta' Konċentrazzjoni x Żmien (C × t). Karatteristiċi primarji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma l-kapaċità li jipprovdi relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons b'firxa minn riżultati mhux letali għal dawk letali sabiex jag]ti konċentrazzjoni letali medjana (LC_{50}), livell limitu ta' konċentrazzjoni mhux letali (eż. LC01), u angolu, u biex possibbilment jidentifika suxxettibbiltà sesswali. Il-Protokoll C × t għandu jintuża meta jkun hemm ħtieġa regolatorja jew xjentifika speċifika li ssejjaħ għall-ittestjar ta' annimali tul durati multipli ta' żmien, bħal għall-finijiet ta' ppjanar ta' rispons għal emerġenza [eż. li jidderivaw valuri ta' Linji Gwida ta' Livelli ta' Espożizzjoni Akuta (AEGL), Linji Gwida ta' Ppjanar għal Rispons ta' Emerġenza (ERPG), jew Livelli Limiti ta' Espożizzjoni Akuta (AETL)], jew għal ippjanar ta' użu ta' artijiet.

2. Gwida dwar it-tmexxija u l-interpretazzjoni tal-istudji dwar dan il-Metodu ta' Ttestjar tinsab fid-Dokument ta' Gwida dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta (GD 39) (2).

3. Id-definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u f'GD 39 (2).

4. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jgħin għal karatterizzazzjoni ta' kimiċi u l-valutazzjoni tar-riskju kwantitattiv, u jippermetti li l-kimiċi għall-ittestjar ikunu ggradati u kklassifikati skont ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (3). GD 39 (2) jipprovdi gwida għall-għażla tal-Metodu ta' Ttestjar adattat għal ittestjar akut. Meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar klassifikazzjoni u tikkettar biss, ġeneralment huwa rrakkomandat il-kapitolu B.52 ta' dan l-Anness (4) [ara GD 39 (2)]. Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.2 mhux maħsub speċifikatament għall-ittestjar ta' materjali speċjalizzati, bħal materjali isometriċi jew fibruži li ftit jinħallu jew nanomaterjali manifatturati.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

5. Qabel ma jitqies l-ittestjar skont dan il-Metodu ta' Ttestjar l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar, inklużi studji eżistenti (eż. il-kapitolu B.52 ta' dan l-Anness (4)) li d-dejta tagħhom tkun tappoġġa li ma jsirx ittestjar addizzjonali, għandhom jitqiesu mil-laboratorji tal-ittestjar biex ikun imminimizzat l-użu tal-annimali. L-informazzjoni li tista' tassisti fl-għażla tal-ispeċi, razza, sess, mod ta' espożizzjoni u konċentrazzjonijiet ta' testijiet l-aktar adatti tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; l-użijiet mistennija u l-potenzjal għal espożizzjoni umana; id-dejta (Q)SAR disponibbli u d-dejta tossikoloġika dwar sustanzi strutturalment relatati [ara GD 39 (2)].

▼M4

6. L-ittestjar ta’ kimiċi għall-ittestjar, korrużivi u/jew irritanti f’konċentrazzjonijiet li jkunu mistennija jikkawżaw uġigħ sever u/jew diffikultà għandu jkun evitat kemm jista’ jkun possibbli. Il-potenzjal korrusiv/irritanti għandu jiġi evalwat skont ġudizzju espert bl-użu ta’ evidenza bħall-esperjenza tal-bniedem jew tal-annimali (eż. minn studji ripetuti ta’ doża li jitwettqu f’konċentrazzjonijiet mhux korrusivi/irritanti), dejta eżistenti *in vitro* (eż. mill-kapitoli B.40, (5), B.40bis (6) ta’ dan l-Anness jew OECD TG 435 (7)), il-valuri tal-pH, informazzjoni minn sustanzi simili jew kwalunkwe dejta pertinenti oħra, għall-iskop ta’ investifazzjoni dwar jekk jista’ ma jsirx iktar ittestjar. Għal ħtiġijiet regolatorji speċifiċi (eż. għal skopijiet ta’ ippjanar ta’ emerġenza), dan il-Metodu ta’ Ttestjar jista’ jintuża biex l-annimali jiġu esposti għal dawn il-materjali għaliex jipprovdi d-direttur jew l-investigatur prinċipali tal-istudju li għandu kontroll fuq is-selezzjoni tal-konċentrazzjonijeit fil-mira. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet immirati ma għandhomx jiġġeneraw effetti ta’ irritazzjoni/korrużivi severi, iżda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta’ konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilħqu l-għan regolatorju u xjentifiku tat-test. Dawn il-konċnetrazzjonijiet għandhom jingħażlu abbażi ta’ każ b’każ u għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni għall-għażla tal-konċentrazzjoni [see GD 39 (2)].

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. Dan il-Metodu ta’ Ttestjar B.2 rivedut tfassal biex tinkiseb informazzjoni suffiċjenti dwar it-tossiċità akuta ta’ kimika għall-ittestjar biex tkun tista’ tiġi kklassifikata u biex jipprovdi dejta dwar il-letalità (eż. $LC_{50,}$ LC_{01} u l-angolu) għal wieħed jew għaż-żewġ sessi kif meħtieġ għall-valutazzjonijiet tar-riskji kwantitattivi. Dan il-Metodu ta’ Ttestjar joffri żewġ metodi. L-ewwel metodu huwa protokoll tradizzjonali li fih gruppi ta’ annimali jiġu esposti għal konċentrazzjoni limitata (test ta’ limitu) jew għal serje ta’ konċentrazzjonijiet fi proċedura pass pass għal durata predeterminata normalment 4 sigħat. Jistgħu japplikaw durati oħra ta’ espożizzjoni biex jaqdu skopijiet regolatorji speċifiċi. It-tieni metodu (C × t) huwa protokoll li fih gruppi ta’ annimali jkunu esposti għal waħda (konċentrazzjoni limitata) jew għal serje ta’ konċentrazzjonijiet multipli matul durati multipli.

8. L-annimali moribondi jew annimali li ċarament huma muġugħa jew li jkunu qed juru sinjali ta’ diffikultà severa jew fit-tul għandhom jinqatlu b’mod uman u jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultat tat-test bl-istess mod bħall-annimali li jkunu mietu waqt it-test. Il-kriterji għal teħid tad-deċiżjoni li annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu ħafna jinqatlu, u gwida dwar ir-rikonoxximent ta’ mewta prevedibbli jew imminenti, huma s-suġġett ta’ Document ta’ Gwida Nru 19 tal-OECD dwar il-Punti tat-Tmiem b’Mod Uman (8).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċijiet tal-annimali

9. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f’saħħithom ta’ razez li normalment jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi preferuta hija l-far u għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw speċijiet oħra.

Preparazzjoni tal-annimali

10. In-nisa għandhom ikunu qatt ma welldu u m’għandhomx ikunu tqal. Fil-jum ta’ espożizzjoni, l-annimali għandhom ikunu adulti żgħażagħ ta’ bejn 8 u 12-il ġimgħa, u li jkunu jiżnu madwar ± 20 % tal-piż medju għal kull sess ta’ kwalunkwe annimal preċedentament qabel tal-istess età. L-annimali jintgħazlu b’mod każwali u jkunu mmarkati għal identifikazzjoni individwalment. L-annimali jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 ijiem qabel ma jibda t-test biex jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. L-annimali għandhom ikunu draw ukoll l-apparat tat-test għal perjodu qasir qabel l-ittestjar, minħabba li dan inaqqas it-tensjoni kkawżata bl-introduzzjoni għall-ambjent il-ġdid.

▼M4

Trobbija tal-annimali

11. It-temperatura tal-kamra ta' manutenzjoni tal-annimali esperimentali għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara l-espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-għadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull annimal u għandu jimminimizza t-telf minħabba l-kannibaliżmu u l-ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieħer biss, jista' jkun jeħtiġilhom jidraw it-tubi ta' trażżin. It-tubi ta' trażżin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusklu. Jekk tkun disponibbli dejta ġenerika li turi li l-ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa kwalunkwe limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx meħtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trażżin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jitħallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' sħabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, ħlief matul l-espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

Kmamar tal-inalazzjoni

12. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-għan tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-mod preferut ta' espożizzjoni huwa mill-imnieħer biss (liema fraži tinkludi r-ras biss, l-imnieħer biss jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieħer biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu aħjar billi tintuża modalità ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu, iżda dan għandu jkun iġġustifikat fir-rapport tal-istudju. Biex tkun żgurata stabbiltà tal-atmosfera meta tintuża kamra għall-ġisem kollu, il-volum totali tal-annimali tat-test m'għandux ikun aktar minn 5 % tal-volum tal-kamra. Il-prinċipji tat-tekniki tal-espożizzjoni mill-imnieħer biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma deskritti f'GD 39 (2).

KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Amministrazzjoni ta' konċentrazzjonijiet

13. L-espożizzjonijiet mill-imnieħer biss jistgħu jkunu ta' kwalunkwe durata sa 6 siegħat għall-firien. Jekk il-ġrieden ikunu esposti mill-imnieħer biss, l-espożizzjonijiet ġeneralment m'għandhomx ikunu itwal minn 4 siegħat. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk ikunu meħtieġa studji li jdumu aktar [ara GD 39 (2)]. L-annimali esposti għall-aerosols fi kmamar għall-ġisem kollu għandhom jingħalqu individwalment biex ma jitħallewx jibilgħu kimika għall-ittestjar minħabba t-tindif ta' sħabhom fil-gaġġa. M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzzjoni. Jista' jingħata ilma matul l-espożizzjoni kollha mill-ġisem kollu.

14. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew taħlita tagħhom. L-istat fiżiku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fiżika li x'aktarx tkun preżenti matul l-immaniġġar u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet li jistgħu jisplodu.

▼M4

Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli

15. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex jitħalla jkun hemm espożizzjoni tar-reġjuni kollha rilevanti tas-sistema respiratorja, huma rrakkomandati aerosols b'dijametri ajrudinamiċi ta' medja massa (MMAD) f'firxa minn 1 sa 4 μm b'devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g) fil-firxa ta' 1,5 sa 3,0 (2) (9) (10). Għalkemm għandu jsir sforz raġonevoli biex dan l-istandard jintlaħaq, għandu jingħata ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, id-dħaħen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u l-partiċelli, fibri u materjali igroskopiċi mimlijin (li jikbru fid-daqs fl-ambjent niedi tas-sistema respiratorja) jistgħu jaqbżu dan l-istandard.

Preparazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'vejjikolu

16. Jista' jintuża vejjikolu biex jiġġenera konċentrazzjoni u daqs ta' partiċelli xierqa tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera. Bħala regola, l-ilma għandu jingħata preferenza. Il-materjal tal-partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex tinkiseb id-distribuzzjoni tad-daqs meħtieġ ta' partiċelli, iżda, għandha tingħata attenzjoni biex il-kimika għall-ittestjar ma tiddekomponix jew tinbidel. F'każijiet fejn proċessi mekkaniċi jitqiesu li jkunu bidlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar (eż. temperaturi estremi minn tħin eċċessiv minħabba l-frizzjoni), il-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun ivverifikata b'mod analitiku. Għandha tingħata attenzjoni adegwata biex il-kimika għall-ittestjar ma tkunx ikkontaminata. Mhux meħtieġ li jkunu ttestjati materjali granulari li ma jiżżartux li jkunu fformulati apposta biex ma jkunux jistgħu jittieħdu man-nifs. Għandu jintuża test ta' attrizzjoni biex jintwera li partiċelli li jistgħu jittieħdu man-nifs ma jkunux prodotti meta jintmiss il-materjal granulari. Jekk test ta' attrizzjoni jipproduċi sustanzi li jistgħu jittieħdu man-nifs, għandu jsir test għat-tossiċità tal-inalazzjoni.

Annimali ta' kontroll

17. Mhux meħtieġ grupp ta' kontroll konkurrenti negattiv (arja). Meta vejjikolu, minbarra l-ilma, jintuża biex jassisti fil-ġenerazzjoni tal-atmosfera tat-test, grupp ta' kontroll ta' vejjikoli għandu jintuża biss meta ma tkunx disponibbli dejta storika ta' teħid ta' tossiċità man-nifs. Jekk studju dwar it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma juri ebda tossiċità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata; għalhekk ma jkunx meħtieġ kontroll ta' vejjikolu.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Fluss tal-arja fil-kamra

18. Il-fluss tal-arja mal-kamra għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u rreġistrat mill-anqas kull siegħa matul kull espożizzjoni. Il-monitoraġġ ta' konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdi mezz indirett għall-kontroll tal-parametri dinamiċi rilevanti kollha tal-ġenerazzjoni tal-atmosfera. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex tkun evitata inalazzjoni mill-ġdid fi kmamar għall-imnieħer biss f'każijiet fejn fluss tal-arja mis-sistema ta' espożizzjoni ma jkunx adegwat biex jipprovdi fluss dinamiku ta' atmosfera tal-kimika għall-ittestjar. Hemm metodoloġiji preskritti li jistgħu jintużaw biex jintwera li inalazzjoni mill-ġdid ma ssirx skont il-kundizzjonijiet operattivi magħżula (2) (11). Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u l-konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wieħed jemmen li dawn l-istandards ma jkunux jistgħu jintlaħqu, il-konċentrazzjonijiet tal-ossiġnu u tad-dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu.

▼M4

Temperatura tal-kamra u umdità relattiva

19. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm għal 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieħer biss kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata u rreġistrata mill-anqas tliet darbiet għal durati sa 4 sigħat, u kull siegħa għal durati iqsar. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati taħlitiet ibbażati fl-ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minħabba interferenza minn kimika għall-ittestjar mal-metodu tal-ittestjar.

Kimika għall-ittestjar: Konċentrazzjoni nominali

20. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominal tal-kamra ta' espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda paragun tal-konċentrazzjoni nominali u l-konċentrazzjoni attwali jagħti indikazzjoni tal-effiċjenza tal-ġenerazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, jista' jintuża biex jiżvela problemi ta' ġenerazzjoni.

Kimika għall-ittestjar: Konċentrazzjoni attwali

21. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu b'metodi speċifiċi (eż. teħid direttta' kampjuni, metodi ta' assorbiment jew kimiċi reattivi u karatterizzazzjoni analitika sussegwenti) jew b'metodi mhux speċifiċi bħal analiżi gravimetrika b'filtru. L-użu ta' analiżi gravimetrika huwa aċċettabbli biss għal aerosols tat-trab b'komponent wieħed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilità baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għal kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'ħafna komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analiżi gravimetrika. Iżda din teħtieġ dejta analitika li turi li l-kompożizzjoni tal-materjal fl-arja tkun simili għall-materjal tal-bidu. Jekk din l-informazzjoni ma tkunx disponibbli, tista' tkun meħtieġa analiżi mill-ġdid tal-kimika għall-ittestjar (idealment fl-istat tagħha fl-arja) f'intervalli regolari waqt li jkun għaddej l-istudju. Għal aġenti tal-aerosols li jistgħu jevaporaw jew jissubblimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha nġabru bil-metodu magħżul. Il-konċentrazzjonijiet immirati, nominali u attwali għandhom ikunu pprovduti fir-rapport tal-istudju, iżda fl-analiżi jintużaw biss konċentrazzjonijiet attwali ta' statistika biex ikunu kkalkulati l-valuri ta' konċentrazzjonijiet letali.

22. Għandu jintuża lott wieħed tal-kimika għall-ittestjar, jekk ikun possibbli, u l-kampjun tat-test għandu jinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-purezza, l-omoġeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbeda l-istudju, għandu jkun hemm karatterizzazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkluża l-purezza tagħha, u jekk teknikament fattibbli, l-identità u l-kwantitajiet ta' kontaminanti u impuritajiet identifikati. Dan jista' jintwera bid-dejta li ġejja, iżda ma jkunx limitat għaliha: ħin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimi oħra. Għalkemm l-identità tal-kampjun tat-test mhix ir-responsabbiltà tal-laboratorju tat-test, jista' jkun prudenti għal-laboratorju tat-test li jikkonferma l-karatterizzazzjoni tal-isponser mill-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

23. L-atmosfera ta' espożizzjoni għandha tinżamm kemm prattikabbilment kostanti u tkun immonitorjata kontinwament u/jew f'intervalli skont il-metodu ta' analiżi. Meta jittieħed kampjun f'intervalli, il-kampjuni tal-atmosfera tal-kamra għandhom jittieħdu mill-anqas darbtejn għal studju ta' erba' sigħat. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minħabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew konċentrazzjonijiet baxxi, jista' jinġabar kampjun wieħed tul il-perjodu kollu ta' espożizzzjoni. Jekk iseħħ ċaqliq minn kampjun għal

▼M4

kampjun, il-konċentrazzjonijiet ittestjati li jkun imiss għandhom jużaw erba' kampjuni għal kull espożizzjoni. Kampjuni individwali ta' konċentrazzjonijiet tal-kamra m'għandhomx jiddevjaw mill-konċentrazzjoni medja b'aktar minn ± 10 % għall-gassijiet u l-fwar jew ± 20 % għal aerosols likwidi jew solidi. L-ekwilibrazzjoni ta' ħin ma' kamra (t_{95}) għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-ħin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata u din tqis il-ħinijiet meħtieġa biex jinkiseb t_{95}. Il-gwida għall-istima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (2).

24. Għal taħlitiet kumplessi ħafna li jikkonsistu f'gassijiet/fwar, u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodotti/mezzi ta' użu finali b'għan speċifiku), kull faži tista' taġixxi b'mod differenti f'kamra tal-inalazzjoni, għalhekk għandha tintgħażel mill-anqas sustanza (analita) waħda bħala indikatur, normalment is-sustanza attiva prinċipali fit-taħlita, ta' kull faži (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun taħlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-taħlita u mhux biss għas-sustanza jew għall-komponent (analita). L-informazzjoni addizzjonali dwar il-konċentrazzjonijiet attwali tinsab f'GD 39 (2).

Kimika għall-ittestjar: Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli

25. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas darbtejn matul kull espożizzjoni ta' 4 sigħat billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv bħall-għodda ajrudinamika li tagħti d-daqs tal-partiċelli. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza tar-riżultati miksubin minn impattur kaskata jew strument alternattiv, f'dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista' jintuża tul l-istudju kollu. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża b'mod parallell mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-ġbir. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiži tad-daqs tal-partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiži b'filtru [ara GD 39 (2)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-faži bikrija tal-istudju, f'dak il-każ il-kejlijiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jitħallew barra. Għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista' twassal għal ħtieġa ta' ripetizzjoni ta' espożizzjoni. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista' tirriżulta kondensazzjoni ta' fwar fil-formazzjoni ta' aerosol, jew jekk jinstabu partiċelli f'atmosfera ta' fwar b'potenzjal għal faživiet imħallta (ara l-paragrafu 15).

PROĊEDURA

26. Żewġ tipi ta' studji huma deskritti hawn taħt: il-protokoll Tradizzjonali u l-protokoll C × t. Iż-żewġ protokolli jistgħu jinkludu studju ta' osservazzjoni, studju ewlieni, u/jew test ta' limitu (protokoll Tradizzjonali) jew ittestjar f'konċentrazzjoni limitata (C × t). Jekk ikun magħruf li wieħed miż-żewġ sessi jkun aktar suxxettibbli, id-direttur tal-istudji jista' jagħżel li jwettaq dawn l-istudji billi juża biss is-sess suxxettibbli. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Qabel il-bidu, għandha titqies id-dejta kollha disponibbli biex l-użu ta' annimali jkun mill-anqas. Pereżempju, dejta ġġenerata bl-użu tal-kapitolu B.52 ta' dan l-Anness (4) tista' telimina l-ħtieġa ta' studju ta' osservazzjoni, u tista' wkoll turi jekk wieħed miż-żewġ sessi jkunx aktar suxxettibbli [ara GD 39 (2)].

▼M4

PROTOKOLL TRADIZZJONALI

Konsiderazzjonijiet ġenerali: Protokoll tradizzjonali

27. Fi studju tradizzjonali, il-gruppi ta' annimali jkunu esposti għal kimika għall-ittestjar għal perjodu fiss ta' żmien (ġeneralment 4 sigħat) f'kamra tal-espożizzjoni mill-imnieħer biss jew mill-ġisem kollu. L-annimali jkunu esposti għal konċentrazzjoni limitata (test ta' limitu), jew għal mill-anqas tliet konċentrazzjonijiet fi proċedura pass pass (studju ewlieni). Studju ta' osservazzjoni jista' jiġi qabel studju ewlieni sakemm ma tkunx teżisti diġà xi informazzjoni dwar il-kimika għall-ittestjar, bħal studju B.52 li jkun sar qabel [ara GD 39 (2)].

Studju ta' osservazzjoni: Protokoll tradizzjonali

28. Studju ta' osservazzjoni jintuża biex tkun stmata l-qawwa ta' kimika għall-ittestjar, biex ikunu identifikati d-differenzi sesswali fis-suxxettibbiltà, u biex jassisti fl-għażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni ta' espożizzjoni għall-istudju ewlieni jew għat-test tal-limitu. Meta tkun qed issir l-għażla tal-livelli ta' konċentrazzjoni għall-istudju ta' osservazzjoni, għandha tintuża l-informazzjoni kollha disponibbli, inkluża dejta (Q)SAR u dejta għal kimiċi simili. M'għandhomx ikunu esposti aktar minn tliet irġiel u tliet nisa f'kull konċentrazzjoni (jista' jkun hemm ħtieġa ta' 3 annimali/sess biex tkun stabbilita d-differenza sesswali). Studju ta' osservazzjoni jista' jikkonsisti f'konċentrazzjoni waħda, iżda jistgħu jiġu ttestjati aktar konċentrazzjonijiet jekk ikun meħtieġ. Studju ta' osservazzjoni m'għandux jittestja tant annimali u konċentrazzjonijiet li jkun jixbah studju ewlieni. Jista' jintuża studju B.52 li kien sar qabel (4) minflok studju ta' osservazzjoni [ara GD 39 (2)].

Test ta' limitu: Protokoll tradizzjonali

29. Test ta' limitu jintuża meta l-kimika għall-ittestjar tkun magħrufa jew tkun mistennija li tkun prattikament mhux tossika, jiġifieri li tislet rispons tossiku 'l fuq biss mill-konċentrazzjoni regolatorja tal-limitu. F'test ta' limitu, grupp wieħed ta' tliet irġiel u tliet nisa jkun espost għall-kimika għall-ittestjar f'konċentrazzjoni limitata. L-informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar tista' tinkiseb minn tagħrif dwar kimiċi ttestjati bl-istess mod, filwaqt li jitqiesu l-identità u l-perċentwali ta' komponenti magħrufin li jkunu ta' sinifikat tossikoloġiku. F'dawk is-sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ftit jew ebda informazzjoni dwar it-tossiċità tagħha, jew fejn il-kimika għall-ittestjar hija mistennija li tkun tossika, għandu jsir it-test ewlieni.

30. L-għażla ta' konċentrazzjonijiet ta' limitu normalment tiddependi minn rekwiżiti regolatorji. Meta jintuża r-Regolament (KE) Nru 1272/2008, il-konċentrazzjonijiet ta' limitu għall-gassijiet, il-fwar u l-aerosols jkunu ta' 20 000 ppm, 20 mg/l u 5 mg/l, rispettivament (jew il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb) (3). Tista' tkun ta' sfida teknika li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet ta' limitu ta' xi kimiċi għall-ittestjar, speċjalment bħala fwar u aerosols. Meta jkunu ttestjati l-aerosols, l-għan primarju għandu jkun li jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jitteħed man-nifs (MMAD ta' 1-4 μm). Dan huwa possibbli għal kważi l-kimiċi kollha għall-ittestjar f'konċentrazzjoni ta' 2 mg/l. L-ittestjar ta' aerosols f'aktar minn 2 mg/l għandu jkun ittentat biss jekk ikun jista' jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs [ara GD 39 (2)]. Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 jiskuraġġixxi l-ittestjar li jeċċedi konċentrazzjoni limitata għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali (3). Il-konċentrazzjoni limitata għandha titqies biss meta jkun hemm probabbiltà kbira li riżultati ta' test bħal dan ikun se jkollhom rilevanza diretta għall-protezzjoni tas-saħħa tal-bniedem (3), u tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta' studju. Fil-każ ta' kimiċi għall-ittestjar potenzjalment esplożivi, għandha tingħata attenzjoni biex ikunu evitati kundizzjonijiet favorevoli għal splużjoni. Biex ikun evitat l-użu mhux meħtieġ tal-annimali, għandu jsir test ta' prova mingħajr l-annimali qabel it-test ta' limitu sabiex ikun żgurat li l-kundizzjonijiet tal-kamra għat-test ta' limitu jkunu jistgħu jinkisbu.

▼M4

31. Jekk ikunu osservati mortalità jew annimali moribondi fil-konċentrazzjoni limitata, ir-riżultati tat-test ta' limitu jistgħu jservu bħala studju ta' osservazzjoni għal ittestjar ulterjuri f'konċentrazzjonijiet oħra (ara l-istudju ewlieni). Jekk il-proprjetajiet fiżiċi jew kimiċi ta' kimika għall-ittestjar jagħmluha impossibbli li tinkiseb konċentrazzjoni limitata, għandha tiġi ttestjata l-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb. Jekk ikun hemm anqas minn 50 % ta' letalità fil-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb, ma jkunx meħtieġ aktar ittestjar. Jekk il-konċentrazzjoni limitata ma' kinitx tista' tinkiseb, ir-rapport ta' studju għandu jipprovdi spjegazzjoni u dejta ta' sostenn. Jekk il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb ta' fwar ma tislitx tossiċità, jista' jkun meħtieġ li tkun iġġenerata kimika għall-ittestjar bħala aerosol likwidu.

Studju ewlieni: Protokoll tradizzjonali

32. Studju ewlieni tipikament isir billi jintużaw ħames irġiel u ħames nisa (jew 5 annimali tas-sess suxxettibbli, jekk ikun magħruf) għal kull livell ta' konċentrazzjoni, b'mill-anqas tliet livelli ta' konċentrazzjoni. Għandhom jintużaw livelli suffiċjenti ta' konċentrazzjoni biex tinkiseb analiżi robusta tal-istatistika. L-intervall ta' żmien bejn il-gruppi ta' espożizzjoni huwa determinat malli jfaqqgħu s-sinjali tossiċi, kemm idumu u s-severità tagħhom. L-espożizzjoni tal-annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha titħalla għal aktar tard sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli ta' sopravivenza għall-annimali li jkunu ġew ittestjati qabel. Dan jippermetti lid-direttur tal-istudju jaġġusta l-konċentrazzjoni mmirata għall-grupp ta' espożizzjoni li jkun imiss. Minħabba d-dipendenza fuq teknoloġiji sofistikati, dan mhux dejjem jista' jkun prattikabbli fi studji dwar l-inalazzjoni, għalhekk l-espożizzjoni tal-annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha tkun ibbażata fuq esperjenza preċedenti u fuq ġudizzju xjentifiku. GD 39 (2) għandu jkun ikkonsultat meta jkunu ttestjati it-taħlitiet.

PROTOKOLL TAL-KONĊENTRAZZJONI X ĦIN (C × T)

Konsiderazzjonijiet ġenerali: Protokoll C × t

33. Studju C × t pass pass jista' jitqies bħala alternattiva għall-protokoll Tradizzjonali għall-valutazzjoni tat-tossiċità tal-inalazzjoni (12) (13) (14). Dan l-approċċ jippermetti li l-annimali jkunu esposti għal kimika għall-ittestjar f'diversi livelli ta' konċentrazzjoni u għal durati multipli ta' żmien. L-ittestjar kollu jsir f'kamra għall-imnieħer biss (kmamar għall-ġisem kollu mhumiex prattiċi għal dan il-protokoll). Dijagramma tal-fluss tagħti illustrazzjoni ta' dan il-protokoll fl-Appendiċi 1. Analiżi ta' simulazzjoni wriet li l-protokoll Tradizzjonali u l-protokoll C × t it-tnejn huma kapaċi jrendu valuri robusti ta' LC_{50}, iżda l-protokoll C × t huwa ġeneralment aħjar biex irendi valuri robusti ta' LC_{01} u LC_{10} (15).

34. Analiżi ta' simulazzjoni wriet li l-użu ta' żewġ annimali għal kull intervall ta' C × t (wieħed għal kull sess billi jintużaw iż-żewġ sessi, jew tnejn tas-sess l-aktar suxxettibbli) jista' ġeneralment ikun adegwat meta jkunu ttestjati durati ta' 4 konċentrazzjonijiet u 5 espożizzjonijiet fi studju ewlieni. F'xi ċirkostanzi, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża żewġ firien għal kull sess għal kull intervall C × t (15). L-użu ta' 2 annimali għal kull sess għal kull konċentrazzjoni u punt ta' ħin jista' jnaqqas il-parzjalità u l-varjabbiltà tal-istimi, iżid ir-rata ta' suċċess tal-istimi, u jtejjeb il-kopertura tal-intervall ta' kunfidenza. Iżda f'każ li dan ma jkunx suffiċjenti biex jaqbel eżatt mad-dejta għall-istima (meta jintuża annimal wieħed għal kull sess jew żewġ annimali tas-sess l-aktar suxxettibbli) tista' wkoll tkun biżżejjed il-ħames (5) espożizzjoni ta' konċentrazzjoni. Gwida ulterjuri dwar l-għadd ta' annimali u konċentrazzjonijiet li għandhom jintużaw fi studju C × t tinsab f'GD 39 (2).

▼M4

Studju ta' osservazzjoni: Protokoll C × t

35. Studju ta' osservazzjoni jintuża biex tkun stmata l-qawwa ta' kimika għall-ittestjar u biex jassisti fl-għażla tal-livelli ta' konċentrazzjoni ta' espożizzjoni għall-istudju ewlieni. Jista' jkun meħtieġ studju ta' osservazzjoni li juża sa tliet annimali/sess/konċentrazzjoni [għad-dettalji ara l-Appendiċi III ta' GD 39 (2)] biex tintgħażel il-konċentrazzjoni tal-bidu adattata għall-istudju ewlieni u biex ikun imminimizzat l-għadd ta' annimali użati. Jista' jkun meħtieġ li jintużaw tliet annimali għal kull sess biex tkun stabbilita differenza sesswali. Dawn l-annimali għandhom ikunu esposti għal durata waħda, ġeneralment ta' 240 minuta. Il-fattibbiltà tal-ġenerazzjoni tal-atmosfera adegwata tat-testijiet għandha tkun ivvalutata matul testijiet tekniċi li jsiru qabel mingħajr annimali. Ġeneralment ma jkunx meħtieġ li jsir studju ta' osservazzjoni jekk tkun disponibbli dejta tal-mortalità mill-istudju B.52 (4). Meta tkun qed issir l-għażla tal-konċentrazzjoni inizjali mmirata fl-istudju B.2, id-direttur tal-istudju għandu jqis ix-xejriet tal-mortalità osservati f'kull studju B.52 disponibbli (4) għaż-żewġ sessi u għall-konċentrazzjonijiet kollha ttestjati [ara GD 39 (2)].

Konċentrazzjoni inizjali: Protokoll C × t

36. Il-konċentrazzjoni inizjali (Sessjoni ta' Espożizzjoni I) (Appendiċi 1) tkun konċentrazzjoni limitata jew konċentrazzjoni magħżula mid-direttur tal-istudju abbażi tal-istudju ta' osservazzjoni. Il-gruppi ta' annimal wieħed/-sess wieħed ikunu esposti għal din il-konċentrazzjoni għal durati multipli (eż. 15, 30, 60, 120, jew 240 minuta), li jirriżultaw f'għadd totali ta' 10 annimali (msejħa s-Sessjoni ta' Espożizzjoni I) (Appendiċi 1).

37. L-għażla ta' konċentrazzjonijiet limitati normalment tiddependi minn rekwiżiti regolatorji. Meta jintuża r-Regolament (KE) Nru 1272/2008, il-konċentrazzjonijiet limitati għall-gassijiet, il-fwar u l-aerosols jkunu ta' 20 000 ppm, 20 mg/l u 5 mg/l, rispettivament (jew il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb) (3). Tista' tkun ta' sfida teknika li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet ta' limitu ta' xi kimiċi għall-ittestjar, speċjalment bħala fwar u aerosols. Meta jkunu ttestjati l-aerosols, l-għan għandu jkun li jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs (jiġifieri MMAD ta' 1-4 μm) f'konċentrazzjoni limitata ta' 2 mg/l. Dan huwa possibbli b'ħafna mill-kimiċi għall-ittestjar. L-ittestjar tal-aerosols f'aktar minn 2 mg/l għandu jkun ippruvat biss jekk ikun jista' jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs [ara GD 39 (2)]. Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 jiskuraġġixxi l-ittestjar li jeċċedi konċentrazzjoni limitata għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali (3). L-itestjar li jeċċedi l-konċentrazzjoni limitata għandu jitqies biss meta jkun hemm probabbiltà kbira li r-riżultati ta' test bħal dan se jkollhom rilevanza diretta għall-protezzjoni tas-saħħa tal-bniedem (3), u għandha tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta' studju. Fil-każ ta' kimiċi għall-ittestjar potenzjalment esplożivi, għandha tingħata attenzjoni biex ikunu evitati kundizzjonijiet favorevoli għal splużjoni. Biex ikun evitat l-użu mhux meħtieġ tal-annimali, għandha titwettaq eżekuzzjoni tat-test mingħajr annimali qabel l-ittestjar fil-konċentrazzjoni inizjali biex ikun żgurat li l-kundizzjonijiet tal-kamra għal din il-konċentrazzjoni jkunu jistgħu jinkisbu.

38. Jekk ikunu osservati mortalità jew annimali moribondi fil-konċentrazzjoni inizjali, ir-riżultati f'din il-konċentrazzjoni jistgħu jservu bħala punt tat-tluq għall-ittestjar ulterjuri f'konċentrazzjonijiet oħra (ara l-istudju ewlieni). Meta l-proprjetajiet fiżiċi jew kimiċi ta' kimika għall-ittestjar jagħmluha impossibbli li tinkiseb konċentrazzjoni limitata, il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb għandha tiġi ttestjata. Jekk ikun hemm anqas minn 50 % ta' letalità fil-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb, ma jkunx meħtieġ aktar ittestjar. Jekk il-konċentrazzjoni limitata ma' kinitx tista' tinkiseb, ir-rapport ta' studju għandu jipprovdi spjegazzjoni u dejta ta' sostenn. Jekk il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb ta' fwar ma tislitx tossiċità, jista' jkun meħtieġ li tkun iġġenerata kimika għall-ittestjar bħala aerosol likwidu.

▼M4

Studju ewlieni: Protokoll C × t

39. Il-konċentrazzjoni inizjali (Sessjoni ta' Espożizzjoni I) (Appendiċi 1) ittestjata fl-istudju ewlieni tkun konċentrazzjoni limitata jew konċentrazzjoni magħżula mid-direttur tal-istudju abbażi tal-istudju ta' osservazzjoni. Jekk tqkun ġiet osservata mortalità matul jew wara s-Sessjoni ta' Espożizzjoni I, l-espożizzjoni minima (C × t) li tirriżulta f'mortalità titthieħed bħala gwida biex tkun stabbilità l-konċentrazzjoni u l-perjodi ta' espożizzjoni għas-Sessjoni ta' Espożizzjoni II. Kull Sessjoni ta' Espożizzjoni sussegwenti tkun tiddependi mis-sessjoni ta' qabel (ara l-Appendiċi 1).

40. Għal ħafna kimiċi għall-ittestjar ir-riżultati miksubin fil-konċentrazzjoni inizjali, flimkien ma' tliet sessjonijiet ta' espożizzjoni addizzjonali b'distribuzzjoni anqas ta' ħin (jiġifieri l-ispazjar ġeometriku ta' perjodi ta' espożizzjoni kif indikat mill-fattur bejn perjodi suċċessivi, ġeneralment √2), għandhom ikunu suffiċjenti biex tkun stabbilita r-relazzjoni ta' mortalità C × t (15), iżda jista' jkun ħemm xi benefiċċju għall-użu ta' ħames (5) konċentrazzjoni ta' espożizzjoni [ara l-Appendiċi 1 u GD 39 (2)]. Għal trattament matematiku tar-riżultati għall-protokoll C × t, ara l-Appendiċi 1.

OSSERVAZZJONIJIET

41. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament sikwit matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Wara espożizzjoni, l-osservazzjonijiet kliniċi għandhom isiru mill-anqas darbtejn fil-jum tal-espożizzjoni jew aktar sikwit meta indikat mir-rispons tal-annimali għat-trattament, u mill-anqas darba kuljum minn hemm 'il quddiem għal total ta' 14-il jum. It-tul tal-perjodu ta' osservazzjoni ma jkunx iffissat, iżda għandu jkun iddeterminat min-natura u miżżmien meta jfaqqgħu s-sinjali kliniċi u mit-tul tal-perjodu ta' rkupru. Id-drabi li fihom jidhru u jgħibu s-sinjali ta' tossiċità huma importanti, l-aktar jekk ikun hemm tendenza li s-sinjali ta' tossiċità jdumu ma jidhru. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati sistematikament b'reġistri individwalment miżmumin għal kull annimal. L-annimali li jinstabu li jkunu f'kondizzjoni moribonda u annimali li juru uġigħ sever u/jew sinjali li jdumu ta' diffikultà għandhom jinqatlu b'mod uman għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali. Għandha tingħata attenzjoni meta jsiru eżamijiet għal sinjali kliniċi ta' tossiċità biex meta jidhru ftit għall-bidu u jkun hemm bidliet respiratorji li jgħaddu malajr, li jiġu minn proċedura ta' espożizzjoni, wieħed ma jiħux żball u jaħsibhom tossiċità relatata ma' kimika għall-ittestjar li tkun teħtieġ il-qtil prematur tal-annimali. Għandhom jitqiesu l-prinċipji u l-kriterji sommarji fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (GD 19) (7). Meta l-annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.

42. L-osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn u l-membrani mukuża, u wkoll fis-sistema respiratorja, ċirkulatorja, awtonomika u nervuża ċentrali, u fl-attività somatomotorja u x-xejriet ta' mġiba. Meta jkun possibbli, għandha tkun innotata kull divrenzjazzjoni bejn l-effetti lokali u sistemiċi. L-attenzjoni għandha tkun diretta għal osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulżjonijiet, tbeżliq, dijarea, letarġija, irqad u koma. Il-kejl tat-temperatura tar-rektum jista' jipprovdi evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ipo/ipertermja relatati mat-trattament jew l-għeluq.

Piżijiet tal-ġisem

43. Il-piżijiet individwali ta' kull annimal għandhom jiġu rreġistrati darba matul il-perjodu ta' akklimatazzjoni, fil-jum ta' espożizzjoni qabel l-espożizzjoni (jum 0), u mill-anqas fil-jiem 1, 3 u 7 (u kull ġimgħa minn hemm 'il quddiem), u fil-ħin tal-mewt jew ewtanasja jekk jaqbżu l-ewwel (1) jum. Il-piż tal-ġisem huwa rikonoxxut bħala indikatur kritiku tat-tossiċità, għalhekk annimali li juru tnaqqis sostnut ta' > 20 %, meta mqabbel ma' valuri ta' qabel l-istudju, għandhom ikunu mmonitorjati mill-qrib. L-annimali li jibqgħu ħajjin jintiżnu u jinqatlu b'mod uman fi tmiem il-perjodu ta' wara l-espożizzjoni.

▼M4

Patoloġija

44. L-annimali kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jinqatlu bl-ewtanasja u jitneħħew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal awtopsja makroskopika. Jekk ma tkunx tista' ssir l-awtopsja minnufih wara li jkun instab annimal mejjet, l-annimal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperaturi baxxi biżżejjed biex tkun imminimizzata l-awtoliżi. L-awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopiċi kollha għandhom jiġu rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.

45. L-eżamijiet addizzjonali inklużi a priori dawk imfasslin apposta jistgħu jitqiesu li jestendu l-valur interpretattiv tal-istudju, bħall-kejl tal-piż tal-pulmun ta' firien li jkunu baqgħu ħajjin, u/jew li jipprovdu evidenza ta' irritazzjoni b'eżami mikroskopiku tas-sistema respiratorja. L-organi eżaminati jistgħu jinkludu wkoll dawk li juru evidenza ta' patoloġija makroskopika f'annimali li jibqgħu jgħixu għal 24 siegħa jew aktar, u organi magħrufin jew mistennija li jkunu affettwati. L-eżami mikroskopiku tas-sistema respiratorja kollha jista' jipprovdi informazzjoni utli dwar kimiċi għall-ittestjar li huma reattivi mal-ilma, bħal aċidi u kimiċi igroskopiċi għall-ittestjar.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

46. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwali fir-rigward tal-piżijiet tal-ġisem u s-sejbiet mill-awtopsji. Id-dejta dwar l-osservazzjonijiet kliniċi għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali użati, l-għadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali speċifiċi ta' tossiċità, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-ħin tal-mewt ta' annimali individwali, deskrizzjoni u kemm jieħdu żmien l-effetti tossiċi u r-riversibbiltà, u s-sejbiet mill-awtopsji.

Rapport tat-test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skont il-każ:

Annimali tat-test u trobbija

— Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: l-għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, il-materjal għall-irqad, it-temperatura ambjentali u l-umdità relattiva, il-fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta;

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far;

— Għadd, età u sess tal-annimali;

— Metodu ta' każwalità;

— Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma);

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test, inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard;

▼M4

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża l-isomerizzazzjoni);

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS), jekk ikunu magħrufa;

Vejjikolu

— Ġustifikazzjoni għal użu ta' vejjikolu u ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

— Dejta storika jew konkurrenti li turi li l-vejjikolu ma jfixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni tal-kamra tal-inalazzjoni inklużi d-dimensjonijiet u l-volum;

— Sors u deskrizzjoni tat-tagħmir użat għall-espożizzjoni tal-annimali kif ukoll għall-ġenerazzjoni tal-atmosfera;

— Tagħmir għall-kejl tat-temperatura, umdità, daqs tal-partiċelli u konċentrazzjoni attwali;

— Sors tal-arja u trattament tal-arja pprovduta/estratta u sistema użata għal kondizzjonament;

— Metodi użati għall-kalibrazzjoni tat-tagħmir biex tkun żgurata atmosfera omoġenea tat-test;

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva);

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieħer biss); tqegħid tal-annimali fis-sistema (il-ġisem kollu);

— Omoġeneità/stabbiltà temporali tal-atmosfera tat-test;

— Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u teħid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;

— Rati tal-fluss tal-arja, rata tal-fluss tal-arja/port ta' espożizzjoni (imnieħer biss), jew toqol tal-annimali/kamra (il-ġisem kollu);

— Informazzjoni dwar it-tagħmir użat għall-kejl tal-ossiġenu u tad-dijossidu tal-karbonju, jekk applikabbli;

— Ħin meħtieġ biex jintlaħaq ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t_{95})

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli);

Dejta ta' espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni;

— Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal ġol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra);

— Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-żona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal taħlitiet li jipproduċu forom fiżiċi etoroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament;

▼M4

— Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (eż. mg/l, mg/m^3, eċċ.); unitajiet ta' volum (eż. ppm, ppb, eċċ.) jistgħu wkoll ikunu rrappurtati f'parenteżi;

— Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli, dijametru ajrudinamiku ta' medja tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σg), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Għandha tkun irrappurtata analiżi waħda għal kull daqs ta' partiċelli;

Kundizzjonijiet tat-test

— Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kwalunkwe proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli ta' materjali solidi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar. F'każijiet fejn il-proċessi mekkaniċi jkunu setgħu biddlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkludi r-riżultati tal-analiżi li tivverifika l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— Deskrizzjoni (preferibbilment inkluża dijagramma) tat-tagħmir użat biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test u biex l-annimali jkunu esposti għall-atmosfera tat-test;

— Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u l-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-teħid tal-kampjuni);

— Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet tat-test;

Riżultati

— Tabulazzjoni tat-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss tal-arja;

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' konċentrazzjoni nominali u attwali tal-kamra;

— Tabulazzjoni tad-dejta dwar id-daqs tal-partiċelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli u l-kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g;

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' rispons u tal-livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, żmien ta' meta jfaqqgħu u kemm idumu l-effetti);

— Piżijiet tal-ġisem individwali tal-annimali miġburin għall-istudju; data u ħin tal-mewt jekk qabel l-ewtanasja skedata, kemm ikun għadda żmien minn meta faqqgħu s-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kinux riversibbli għal kull annimal;

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli;

— Stimi tal-letalità (eż. LC_{50}, LD_{01}) inklużi 95 % limiti ta' kunfidenza, u angolu (jekk ipprovdut mill-metodu ta' evalwazzjoni);

— Relazzjoni tal-istatistika, inkluża stima għall-esponent n (protokoll C × t). Għandu jkun ipprovdut l-isem tas-softwer tal-istatistika użat;

▼M4

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfażi partikolari għad-deskrizzjoni ta' metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-konċentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-partiċelli;

— Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni tal-partiċelli fid-dawl tas-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-partiċelli ma setgħux jitħarsu;

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm ħtieġa li b'mod uman jinqatlu l-annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (8);

— Jekk l-ittestjar skont il-kapitolu B.52 ta' dan l-Anness (4) ma baqax isir favur dan il-Metodu ta' Ttestjar B.2, għandhom ikunu pprovduti l-ġustifikazzjonijiet;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni tal-konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probbbali tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati.

LETTERATURA:

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1).

(4) Il-Kapitolu B.52 ta' dan l-Anness, Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta - Metodu ta' Klassi Akuta Tossika (ATC).

(5) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness: Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test ta' Reżistenza Elettrika Transkutanea (TER).

(6) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test Mudell tal-Ġilda Umana.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 1

Protokoll C × t

1. Jista' jitqies studju pass pass ta' Konċentrazzjoni × Ħin (C × t) bħala alternattiva għall-protokoll Tradizzjonali biex tkun ivvalutata t-tossiċità tal-inalazzjoni (12) (13) (14). Dan għandu jsir b'mod preferenzjalment meta jkun hemm ħtieġa regolatorja jew xjentifika speċifika li ssejjaħ għall-ittestjar ta' annimali tul durati multipli ta' żmien bħal ta' ppjanar ta' rispons għal emerġenza jew ippjanar ta' użu ta' artijiet. Dan l-approċċ normalment jibda bl-ittestjar f'konċentrazzjoni limitata (is-Sessjoni ta' Espożizzjoni I) li fiha l-annimali jkunu esposti għal kimika għall-ittestjar għal ħames durati ta' ħin (eż. 15, 30, 60, 120 u 240 minuta) biex id-durati multipli ta' ħin jinkisbu f'Sessjoni ta' Espożizzjoni waħda (ara l-Figura 1). Meta jintuża r-Regolament (KE) Nru 1272/2008, il-konċentrazzjonijiet limitati għall-gassijiet, fwar u aerosols jkunu ta' 20 000 ppm, 20 mg/l, u 5 mg/l, rispettivament. Dawn il-livelli jistgħu jinqabżu biss jekk ikun hemm ħtieġa regolatorja jew xjentifika għall-ittestjar f'dawn il-livelli (ara l-paragrafu 37 fit-test ewlieni ta' B.2).

2. F'sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ftit jew l-ebda informazzjoni dwar it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar, għandu jsir studju ta' osservazzjoni li fih gruppi ta' mhux aktar minn 3 annimali għal kull sess ikunu esposti għal konċentrazzjonijiet immirati magħżula mid-direttur tal-istudju, ġeneralment ta' 240 minuta.

3. Jekk konċentrazzjoni limitata tkun ittestjata matul is-Sessjoni ta' Espożizzjoni I u tkun osservata mortalità ta' anqas minn 50 %, ma jkunx hemm ħtieġa ta' ttestjar addizzjonali. Jekk ikun hemm ħtieġa regolatorja jew xjentifika biex tkun stabbilità r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni/ħin/rispons f'livelli ogħla mill-konċentrazzjoni limitata indikata, l-espożizzjoni li jkun imiss għandha ssir f'livell ogħla bħall-konċentrazzjoni limitata għal darbtejn (jiġifieri 2L fil-Figura 1).

4. Jekk tkun osservata t-tossiċità fil-konċentrazzjoni limitata, ikun meħtieġ ittestjar addizzjonali (studju ewlieni). Ddawn l-eżpożizzjonijiet addizzjonali jitwettqu f'konċentrazzjonijiet iktar baxxi (fil-Figura 1; Sessjonijiet ta' Espożizzjoni II, III jew IV) jew f'konċentrazzjonijiet ogħla bl-użu ta' durati iqsar (fil-Figura 1: Sessjoni ta' Espożizzjoni IV) bl-użu ta' durati li huma adattati u mhux daqshekk spazjati.

5. It-test (konċentrazzjoni inizjali u konċentrazzjonijiet addizzjonali) isir billi jintuża annimal wieħed/sess wieħed għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin jew b'2 annimali tas-sess aktar suxxettibbli għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin. F'xi ċirkostanzi, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jutilizza 2 firien għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin (jew 4 annimali tas-sess suxxettibbli għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin) (15). L-użu ta' 2 annimali għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin ġeneralment inaqqas mill-parzjalità u mill-varjabbiltà tal-istimi, iżid ir-rata ta' suċċess ta' stimi, u jtejjeb il-kopertura ta' intervall ta' kunfidenza relattiva għall-protokoll kif deskritt hawn. Aktar dettalji jingħataw f'GD 39 (2).

6. Idealment, kull sessjoni ta' espożizzjoni ssir f'jum wieħed. Dan jagħti l-opportunità biex l-espożizzjoni li jkun imiss titħalla għal aktar tard sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli ta' sopravivenza, u tippermetti lid-direttur tal-istudju jaġġusta l-konċentrazzjoni mmirata u d-durati għas-sessjoni ta' espożizzjoni li jkun imiss. Qed jiġi rrakkomandat li kull sessjoni ta' espożizzjoni tinbeda mal-grupp li se jkun espost l-iżjed fit-tul, jiġifieri l-grupp ta' espożizzjoni ta' 240 minuta, warajh il-grupp ta' espożizzjoni ta' 120 minuta, eċċ. Jekk, pereżempju, l-annimali fil-grupp tal-240 minuta jibdew imutu wara 90 minuta jew juru sinjali severi ta' tossiċità (eż. tibidl estrem fix-xjera tat-teħid tan-nifs bħal nifs bi tbagħtija), ma jagħmilx sens li grupp jiġi espost għal 120 minuta għaliex il-mortalità proabbilment tkun 100 %. Għalhekk id-direttur tal-istudju għandu jagħżel durati iqsar ta' espożizzjoni għal dik il-konċentrazzjoni (eż. 90, 65, 45, 33 u 25 minuta).

▼M4

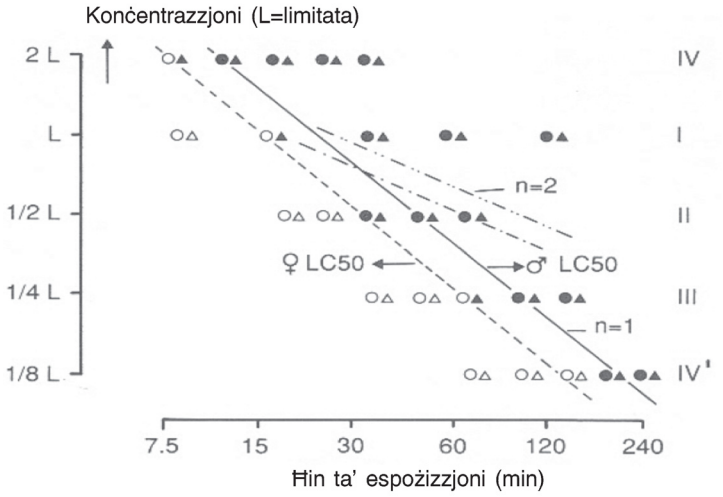
7. Il-konċentrazzjoni tal-kamra għandha titkejjel ta’ spiss biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni medja pożata mal-ħin għal kull perjodu ta’ espożizzjoni. Kull meta jkun possibbli, għandu jintuża l-ħin tal-mewt ta’ kull annimal (iktar milli d-durata ta’ espożizzjoni) fl-analiżi ta’ statistika.

8. Ir-riżultati tal-ewwel erba’ sessjonijiet ta’ espożizzjoni għandhom ikunu eżaminati biex tkun identifikata differenza fid-dejta fil-kurva ta’ konċentrazzjoni-ħin (ara l-Figura 1). F’każ li ma jkunx hemm qbil biżżejjed, tkun tista’ ssir espożizzjoni addizzjonali (il-ħames (5) konċentrazzjoni). Għandhom jintgħażlu durati ta’ konċentrazzjoni u espożizzjoni għall-ħames espożizzjoni (5) biex ikopru din id-differenza.

9. Is-sessjonijiet ta’ espożizzjoni kollha (inkluża l-ewwel Sessjoni ta’ Espożizzjoni) jintużaw biex tkun ikkalkulata r-relazzjoni ta’ konċentrazzjoni-ħin-rispons billi tintuża Analiżi ta’ Statistika (16). Jekk ikun possibbli, għal kull intervall C × t, għandhom jintużaw il-konċentrazzjoni medja pożata mal-ħin u d-durata ta’ espożizzjoni sal-mewt (jekk il-mewt isseħħ matul l-espożizzjoni).

Figura 1

Illustrazzjoni ipotetika tar-relazzjoni ta’ konċentrazzjoni-ħin-mortalità fil-firien.



Simboli miftuħa = superstiti; simboli magħluqa = annimali mejta

Trijangli = nisa; ċrieki = rġiel

Linja kontinwa = valuri LC_{50} (firxa 7,5-240 min) għall-irġiel b’n = 1

Linja maqsuma = valuri LC_{50} (firxa 7,5-240 min) għan-nisa b’n = 1

Linji ttikkjati = linji ta’ valuri LC_{50} ipotetiċi għall-irġiel u għan-nisa jekk n kienet ugwali għal 2 (12).

Glossarju

Konċentrazzjoni:

Ħin ta’ espożizzjoni:

▼M4

10. Hawn taħt hawn eżempju tal-proċedura pass pass:

Sessjoni ta' Espożizzjoni I – Ittestjar fil-konċentrazzjoni limitata (ara l-Figura 1)

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total [a]

— Konċentrazzjoni [b] = konċentrazzjoni limitata.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'din il-konċentrazzjoni mmirata għal durati ta' 15, 30, 60, 120 u 240 minuta, rispettivament.

↓

Sessjoni ta' Espożizzjoni II [c] – Studju Ewlieni

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ta' 10 annimali.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni [d] (1/2L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur √2 spazjat; ara l-Figura 1).

↓

Sessjoni ta' Espożizzjoni III – Studju Ewlieni

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ta' 10 annimali.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni [d] (1/4L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur √2 spazjat; ara l-Figura 1).

↓

Sessjoni ta' Espożizzjoni IV' – Studju Ewlieni

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ta' 10 annimali.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni [d] (1/8L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur √2 spazjat; ara l-Figura 1).

↓ jew

---

[a] Jekk ma tkunx disponibbli informazzjoni dwar is-suxxettibbiltà tas-sessi, jintużaw firien taż-żewġ sessi, jiġifieri annimal wieħed/sess wieħed għal kull konċentrazzjoni. Abbażi ta' informazzjoni eżistenti, jew jekk ikun jidher biċ-ċar matul din is-sessjoni ta' espożizzjoni li sess ikun aktar suxxettibbli mill-ieħor, għandhom jintużaw 10 annimali mis-sess suxxettibbli (2 annimali għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin) f'kull livell ta' konċentrazzjoni matul l-ittestjar sussegwenti. ta' 10 annimali

[b] Meta jintuża r-Regolament (KE) Nru 1272/2008, il-konċentrazzjonijiet ta' limitu għall-gassijiet, il-fwar u l-aerosols huma 20 000 ppm, 20 mg/l u 5 mg/l, rispettivament. F'każ ta' tossiċità mistennija jew ibbażata fuq ir-riżultati tal-istudju ta' osservazzjoni, għandhom jintgħażlu konċentrazzjonijiet tal-bidu aktar baxxi. F'każ ta' ħtiġijiet regolatorji jew xjentifiċi, jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet oħla. mmirata

[c] Idealment, l-espożizzjoni tal-annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha ssir aktar tard sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli ta' sopravivenza għal annimali li jkunu ġew ittrattati qabel. Dan jippermetti lid-direttur tal-istudju jaġġusta l-konċentrazzjoni mmirata u d-durati għas-sessjoni ta' espożizzjoni li tkun imiss.

[d] Id-doża minima (konċentrazzjoni × ħin) li tkun irriżultat f'mortalità matul l-ittestjar fil-konċentrazzjoni inizjali (l-ewwel sessjoni ta' espożizzjoni) tittieħed bħala gwida biex tkun stabbilita t-taħlita li jkun imiss ta' konċentrazzjoni u d-durati ta' espożizzjoni. Tipikament, il-konċentrazzjoni għandha tonqos b'darbtejn (1/2L) u l-annimali jiġu esposti fuq firxa ġdida ta' ħin b'grid iktar fina li tuża diviżjoni ġeometrika ta' perjodi ta' espożizzjoni b'fattur ta' 1.4 (√2; ara r-referenza 11) matul il-ħin skont il-livell minimu tad-doża letali (ħin × konċnetrazzjoni) osservat matul l-ewwel espożizzjoni. F'din il-figura (Figura 1), il-mortalità fis-sessjoni ta' espożizzjoni I kienet osservata l-ewwel darba fil-15-il minuta; id-durati matul is-sessjoni II ikunu, għalhekk, huma ċċentrati għal madwar 30 minuta, u jkunu 15, 21 30, 42 u 60 minuta. Wara l-ewwel żewġ espożizzjonijiet, huwa rrakkomandat ħafna li d-dejta titfassal f'mod simili kif indikat hawn fuq, u li jkun ivverifikat jekk ir-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-ħin ikollhiex angolu ta' 45 grad (n = 1) jew jekk ir-relazzjoni ta' konċentrazzjoni-ħin-rispons tkunx anqas wieqfa (eż. n = 2) jew aktar wieqfa (eż. n = 0,8). Fil-każijiet tal-aħħar huwa rrakkomandat ħafna li l-konċentrazzjonijiet u d-durati li jkun imiss ikunu adattati bl-istess mod. aktar baxxa

▼M4

Sessjoni ta' Espożizzjoni IV – Studju Ewlieni

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ta' 10 annimali.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni (e) (2L) b'durati ta' espożizzjoni ftit aqsar (fattur √2 spazjat; ara l-Figura 1).

Trattament matematiku tar-riżultati għall-protokoll C × t

11. Il-proċedura ta' C × t b'4 jew 5 konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni u ħames durati trendi 20 jew 25 punt ta' dejta, rispettivament. B'dawn il-punti ta' dejta, ir-relazzjoni C × t tista' tkun ikkalkulata billi tintuża analiżi ta' statistika (16):

Ekwazzjoni 1:

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

fejn C = konċentrazzjoni; t = perjodu ta' espożizzjoni, jew

Ekwazzjoni 2:

$$Reazzjoni = f(C^n t)$$

fejn $n = b_1/b_2$.

Bl-użu tal-ekwazzjoni 1, jista' jkun ikkalkulat il-valur LC_{50} għal perjodu ta' ħin partikolari (eż. 4 sigħat, siegħa 1, 30 minuta, jew kwalunkwe perjodu fil-firxa ta' perjodi ta' ħin ittestjati) bl-użu ta' P = 5 (50 % rispons). Innota li r-regola ta' Haber tapplika biss meta n = 1. LC_{01} jista' jkun ikkalkulat bl-użu ta' P = 2,67.

(e) F'ċerti każijiet jista' jkun meħtieġ li l-konċentrazzjoni tiżdied (2L) tul firxa ġdida ta' ħin bi grid terġa aktar fina bl-użu ta' diviżjoni ġeometrika ta' perjodi ta' espożizzjoni b'fattur ta' 1.4 (√2) f'dak il-ħin skont il-livell minimu tal-konċentrazzjoni letali osservat matul l-ewwel espożizzjoni. Id-durata minima ta' espożizzjoni għandha preferibbilment tkun aktar minn 5 minuti; id-durata massima ta' espożizzjoni m'għandhiex tkun aktar minn 8 sigħat."

▼B

B.3. **TOSSIĊITÀ AKUTA (DERMALI)**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (A).

1.2. DEFINIZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (B).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test tiġi applikata fuq il-ġilda f'doži ggradwati lil bosta gruppi ta' annimali sperimentali, doża waħda użata għal kull grupp. Sussegwentement, isiru l-osservazzjonijiet ta' l-effetti u ta' l-imwiet. L-annimali, li jmutu waqt it-test issirilhom in-nekropsija u fl-aħħar tat-test din issir fuq dawk l-annimali li baqgħu ħajjin.

Jista' jagħti l-każ li l-annimali li juru sinjali gravi u li jtulu ta' tbatija u uġigħ jinqatlu b'mod uman. Is-sustanzi għat-test f'dożaġġi magħrufa li jikkawżaw l-uġigħ u t-tbatija minħabba proprjetajiet korrużivi jew ta' irritazzjoni m'għandhomx għalfejn jitwettqu.

1.5. KRITERJI TAL-KWALITÀ

Xejn

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Preparazzjonijiet**

L-annimali huma miżmuma f'fondi sperimentali u f'kundizzjonijiet ta' l-għalf għal mill-anqas ħamest ijiem qabel l-esperiment. Qabel it-test, annimali adulti żgħażagħ b'saħħithom huma magħżula b'mod kif jinzerta u assenjati lejn gruppi għat-trattament. Xi ftit qabel it-testijiet, il-pil huwa maqtugħ miż-żona dorsali tad-dahar ta' l-annimali tat-test. It-tqaxxir jista' jkun użat imma għandu jkun imwettaq madwar 24 siegħa qabel it-test. Meta jsir il-qtugħ jew it-tqaxxir tal-pil, kura għandha tittieħed sabiex ikun evitat xi grif fil-ġilda li jkunu jistgħu jibdlu l-permeabbiltà tagħha. Mhux anqas minn 10 % tal-wiċċ tal-ġisem għandu jkun imnaddaf għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Meta jsiru testijiet tas-solidi, li jistgħu ikunu pulverizzati jekk xieraq, is-sustanza tat-test għandha tkun b'umidità suffiċjenti bl-ilma, jew, meta meħtieġ, apparat adattat sabiex jassigura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Meta jiġi użat xi mezz, għandha tiġi kkunsidrata l-influwenza tiegħu fuq il-penetrazzjoni tal-ġilda bis-sustanza għat-test. Is-sustanzi għat-test likwidi ġeneralment jintużaw mhux maħlula.

1.6.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.6.2.1. *Annimali sperimentali*

Firien jew fniek, jew fniek ta' l-indi adulti jistgħu jintużaw. Speċje oħrajn jistgħu jiġu użati imma l-użu tagħhom ikun jeħtieġ ġustifikazzjoni. Għandhom jintużaw karatteristiċi tal-laboratorju użati b'mod komuni. Fil-bidu ta' kull test, il-medda tal-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi ± 20 % tal-valur medju kif xieraq.

▼B

1.6.2.2. *Numru u sess.*

Mill-anqas 5 annimali huma użati f'kull livell tad-doża. Iridu jkunu ta' l-istess sess. Jekk jintużaw dawk femminili, dawn qatt ma jkunu welldu u mhumiex tqal. Fejn l-informazzjoni hija disponibbli li turi li s-sess partikulari huwa iktar sensittiv, l-annimali ta' dan is-sess għandhom jingħataw id-doża.

Nota: F'testijiet ta' tossiċità akuta b'annimali t'ordni ogħla minn tal-gerriema, l-użu ta' numri iżgħar għandu jiġi kkunsidrat. Id-dożi għandhom jingħażlu bl-attenzjoni, u għandu jsir kull sforz sabiex id-dożi li huma xi ftit tossiċi ma jinqabżux. F'testijiet bħal dawn, l-amministrazzjoni tad-dożi letali tas-sustanza għat-test għandha tiġi evitata.

1.6.2.3. *Livelli tad-doża*

Dawn għandhom ikunu biżżejjed bħala numru, mill-inqas tlieta, u spazjati b'mod xieraq sabiex jipproduċu gruppi ta' test b'medda ta' effetti tossiċi u rati ta' mortalità. Kwalunkwe effetti korrużivi jew ta' irritazzjoni għandhom jiġu kkunsidrati meta jiġu deċiżi l-livelli tad-doża. Id-data għandha tkun biżżejjed biex tipproduċi kurva li turi d-doża/ir-rispons u, fejn hu possibbli, tippermetti determinazzjoni aċċettabbli ta' l- LD_{50}

1.6.2.4. *Test ta' limitazzjoni*

Test ta' limitu f'livell wieħed ta' doża ta' mill-inqas 2 000 mg/kg ta' piż tal-ġisem jista' jitwettaq fi gruppi ta' 5 annimali maskili u 5 femminili, bl-użu tal-proċeduri deskritti hawn fuq. Jekk ikun hemm mortalità compound-related jista' jiġi kkunsidrat studju sħiħ.

1.6.2.5. *Perijodu ta' l-Osservazzjoni*

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun ta' mill-inqas 14-il jum. Madankollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandux ikun issettjat strettament. Għandu jkun determinat mir-reazzjonijiet tossiċi, ir-rata ta' *onset* tagħhom u t-tul tal-perjodu ta' rkupru, u għalhekk jista' jiġi estiż jekk ikun meħtieġ. Il-ħin li fih is-sinjali tat-tossiċità jidhru u jisparixxu, iż-żmien li jieħdu u l-ħin tal-mewt huma importanti, speċjalment jekk ikun hemm it-tendenza li jtulu l-imwiet.

1.6.3. **Il-proċedura**

L-annimali għandhom jinżammu f'gaġeġ individwali. Is-sustanza għat-test għandha tiġi applikata b'mod uniformi fuq żona, li hija bejn wieħed u ieħor 10 % taż-żona totali tal-wiċċ tal-ġisem B'sustanzi ferm tossiċi, iż-żona tal-wiċċ koperta tista' tkun anqas imma kemm jista' jkun miż-żona għandha tkun koperta b'saff irqieq u uniformi kemm jista' jkun possibbli

Matul l-24 siegħa tal-perjodu ta' l-espożizzjoni s-sustanza tat-test tinżamm f'kuntatt mal-ġilda b'garża poruża u faxxa mhux irritanti.Is-sit tat-test għandu jkun aktar kopert b'mod xieraq sabiex iżomm il-faxxex bil-garża u s-sustanza tat-test u jassiguraw li l-annimali ma jkunux jistgħu jilgħaqu u jieklu s-sustanza tat-test. Restrizzjonijiet jistgħu jintużaw sabiex jipprevjenu l-inġestjoni tas-sustanza tat-test, imma l-immobilizzazzjoni kompleta mhix metodu rakkommandat.

▼B

Fi tmiem il-perjodu ta' l-espożizzjoni, għandhom jitneħħew ir-residwi tas-sustanza għat-test, fejn hu prattikabbli, permezz ta' l-ilma jew xi metodu xieraq ieħor ta' tindif tal-ġilda.

L-osservazzjonijiet għandhom jiġu rrekordjati sistematikament kif isiru. Ir-rekords individwali għandhom jinżammu għal kull animal. L-osservazzjonijiet għandhom isiru ta' spiss fl-ewwel jum. Eżaminazzjoni klinika bil-galbu għandha ssir mill-inqas darba kull ġurnata ta' xogħol, l-osservazzjonijiet l-oħra għandhom isiru kuljum b'azzjonijiet xierqa sabiex jiġi minimizzat it-telf ta' annimali mill-istudju eż. In-nekropsija jew ir-refriġerazzjoni ta' dawk l-annimali li jinstabu mejta u l-iżolament jew il-qtil ta' annimali dgħajfa jew li qed imutu.

L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-ġilda u l-pil, fl-għajnejn u membrani mukożji, u anki fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċi u tas-sistema ċentrali tan-nervituri; l-attività somatomotori u l-istil ta' l-imġiba. Għandha tingħata attenzjoni partikulari għall-osservazzjoni ta' tkexkix, konvulżjonijiet, ir-rieq, dijareja, il-letarġija, l-irqad u l-koma. Il-ħin tal-mewt għandu jiġi rrekordjat kemm jista' jkun bl-eżatt. L-annimali li jmutu waqt it-test u dawk li jibqgħu ħajjin fi tmiem it-test huma suġġetti għan-nekropsija. It-tibdil kollu patoloġiku kbir għandu jiġi rrekordjat. Fejn hu indikat, it-tessuti għandhom jittieħdu għall-eżaminazzjoni ħispatoloġika.

Valutazzjoni tat-tossiċità fis-sess l-ieħor.

Wara tmiem l-istudju ta' sess wieħed, mill-inqas grupp wieħed ta' 5 annimali tas-sess l-ieħor jingħata d-doża biex jiġi stabbilit li l-annimali ta' dan is-sess mhumiex iktar sensittivi għas-sustanza tat-test. L-użu ta' inqas annimali jista' jkun ġustifikat f'ċirkostanzi individwali. Fejn hemm informazzjoni xierqa disponibbli li turi li l-annimali tas-sess li qed jiġi ttestjat huma iktar sensittivi, l-ittestjar fuq l-annimali tas-sess l-ieħor jista' ma jsirx.

2. **DATA**

Id-*data* għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, il-ħin tal-mewt ta' l-annimali individwali, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali oħra ta' tossiċità, id-deskrizzjoni ta' l-effetti tossiċi u s-sejbiet ta' nekropsija. Il-piżijiet individwali ta' l-annimali għandhom jiġu determinati u rrekordjati ftit qabel is-sustanza għat-test tiġi applikata. Wara, dan isir kull ġimgħa u mal-mewt it-tibdiliet fil-piż għandhom jiġu kkalkulati u rrekordjati meta l-annimali jibqgħu ħajjin sa ġurnata wara. L-annimali li jiġu maqtula b'mod uman minħabba t-tbatija u l-uġigħ li huma *compound related* huma rrekordjati bħala mwiet *compound-related*. L-LD_{50} għandu jiġi determinat minn metodu rikonoxxut.

Il-valutazzjoni tad-data għandha tinkludi l-valutazzjoni tar-relazzjonijiet, jekk ikun hemm, bejn l-espożizzjoni ta' l-annimali għas-sustanza tat-test u l-okkorrenza u l-gravità ta' l-anormalitajiet kollha, inklużi dawk ta' imġiba u dawk kliniċi, feriti kbar, tibdil fil-piż tal-ġisem, il-mortalità u kwalunkwe effetti tossiċi oħra.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk inhu possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼B

— l-ispeċje, is-silta, is-sors, il-kundizzjonijiet ambjentali, dieta, eċċ.;

— kundizzjonijiet tat-test (inklużu t-tip ta' faxex: okklussivi jew mhux okklussivi);

— il-livelli tad-doża (inkluż il-mezz, jekk użat, u l-konċentrazzjoninijiet);

— is-sess ta' l-annimal li qed jingħata d-doża;

— it-tabulazzjoni tad-data ta' rispons tas-sess u l-livell tad-doża (i.e. in-numru ta' l-annimali li mietu jew inqatlu waqt it-test; in-numru ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità; in-numru ta' annimali esposti);

— il-ħin tal-mewt wara d-dożaġġ, ir-raġunijiet u l-kriterji użati għall-qtil b'mod uman ta' l-annimali;

— l-osservazzjonijiet kollha;

— il-valur LD_{50} għas-sess suġġett għal studju komplet, determinat f'14-il jum bil-metodu ta' determinazzjoni speċifikat;

— 95 % ta' l-intervall ta' kunfidenza għall- LD50 (fejn dan huwa provdut);

— Il-kurva li turi id-doża/il-mortalità fejn hu permess bil-metodu tad-determinazzjoni

— Is-sejbiet tan-nekropsija;

— Kwalunkwe sejbiet ħispatoloġiċi;

— Ir-riżultati ta' kwalunkwe test fuq is-sess l-ieħor;

— Id-diskussjoni tar-riżultati (b'attenzjoni partikulari għall-effett li l-qtil b'mod uman ta' l-annimali jista' jkollu fuq il-valur kalkulat LD50);

— L-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (D).

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (E).

▼M8

B.4. IRRITAZZJONI DERMALI AKUTA/KORRUŻJONI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 404 tal-OECD (2015). Il-linji gwida tal-OECD għall-ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien biex jiġi żgurat li dawn jirriflettu l-aħjar xjenza disponibbli. Fir-rieżami tat-TG 404 tal-OECD, ingħatat attenzjoni speċjali għat-titjib possibbli b'rabta ma' dak li jikkonċerna l-benessri tal-annimali u għall-evalwazzjoni tal-informazzjoni eżistenti kollha dwar is-sustanza kimika tat-test biex ikunu evitati testijiet mingħajr ħtieġa fuq l-annimali tal-laboratorju. Il-verżjoni aġġornata tat-TG 404 tal-OECD (oriġinarjament adottata fl-1981, riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) tinkludi referenza għad-Dokument ta' Gwida dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Irritazzjoni/Korrużjoni tal-Ġilda (1), filwaqt li tipproponi approċċ modulari għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda u għall-korrużjoni tal-ġilda. L-IATA jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u (i) jipprovdi gwida dwar kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (1). Barra minn dan, il-Linja Gwida tirrakkomanda, meta tkun meħtieġa, l-applikazzjoni suċċessiva, minflok simultanja, tat-tliet kumpressi tat-test għall-annimal fit-test inizjali *in vivo*.

2. Id-definizzjonijiet ta' irritazzjoni u ta' korrużjoni dermali huma stabbiliti fl-Appendiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

3. Fl-interess kemm tax-xjenza solida kif ukoll tat-trattament xieraq tal-annimali, l-ittestjar *in vivo* ma għandux isir qabel ma *d-data* disponibbli kollha rilevanti għall-korrużività/irritazzjoni dermali potenzjali tas-sustanza kimika tat-test tkun ġiet evalwata f'analiżi tal-piż tal-evidenza (WoE) kif ippreżentata fid-Dokument ta' Gwida dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, jiġifieri fuq it-tliet Partijiet ta' din il-gwida u l-moduli korrispondenti tagħhom (1). Fil-qosor, fil-Parti 1 id-*data* eżistenti tiġi indirizzata fuq seba' moduli li jkopru d-*data* umana, id-*data in vivo*, id-*data in vitro*, id-*data* dwar il-proprjetajiet fiżikokimiċi (eż. pH, b'mod partikolari aċidità jew alkalinità b'saħħitha) u metodi mhux ta' ttestjar. Fil-Parti 2 issir l-analiżi tad-WoE. Jekk din l-analiżi tad-WoE tibqa' inkonklużiva, il-Parti 3 għandha ssir permezz ta' ttestjar addizzjonali, l-ewwel b'metodi *in vitro*, u bl-ittestjar *in vivo* li jintuża bħala l-aħħar istanza. Għaldaqstant, din l-analiżi għandha tnaqqas il-ħtieġa għall-ittestjar *in vivo* għall-korrussività/irritazzjoni dermali ta' sustanza kimika tat-test li għalihom diġà jkun hemm biżżejjed evidenza minn studji oħra rigward dawk iż-żewġ punti ta' tmiem.

PRINĊIPJU TAT-TEST IN VIVO

4. Is-sustanza kimika tat-test li għandha tkun ittestjata tiġi applikata f'doża singola għall-ġilda ta' annimal sperimentali; iż-żoni tal-ġilda mhux trattati tal-annimal tat-test iservu għall-kontroll. Il-grad tal-korrużjoni/irritazzjoni ikun moqri u rreġistrat matul intervalli speċifiċi u jkun deskritt aktar biex jipprovdi evalwazzjoni sħiħa tal-effetti. Id-durata tal-istudju għandha tkun suffiċjenti biex ikunu evalwati r-riversibbiltà jew in-nuqqas ta' riversibbiltà tal-effetti osservati.

▼M8

5. L-annimali li juru sinjali kontinwi ta' tbatija u/jew uġigħ severi fi kwalunkwe stadju tat-test għandhom jinqatlu bl-ewtanażja, u s-sustanza kimika tat-test għandha tkun ivvalutata kif xieraq. Il-kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni biex jinqatlu bl-ewtanażja l-annimali fi stat ta' agunija jew ta' tbatija severa huma spjegati f'Dokument ta' Gwida separat (2).

PREPARAMENTI GĦAT-TEST IN VIVO

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

6. Il-fenek albino hu l-annimal preferut tal-laboratorju, u jintużaw fniek adulti żgħar f'saħħithom. Ir-raġuni għall-użu ta' speċi oħra għandha tiġi pprovduta.

Preparazzjoni tal-annimali

7. Madwar 24 siegħa qabel it-test, is-suf għandu jitneħħa bi tqaxxir taż-żona dorsali minn fuq id-dahar l-annimali. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat li tinbarax il-ġilda, u għandhom jintużaw biss dawk l-annimli li jkunu b'saħħithom u li jkollhom ġilda intatta.

8. Uħud mir-razez tal-fniek ikollhom irqajja' folti ta' suf li jkunu aktar prominenti f'ċerti żminijiet tas-sena. Tali żoni ta' tkabbir ta' suf folt ma għandhomx jintużaw bħala siti tat-testijiet.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u tal-għalf

9. L-annimali għandhom jinżammu f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali esperimentali għandha tkun ta' 20 °C (± 3 °C) għall-fniek. Filwaqt li l-umdità relattiva għandha tkun tal-anqas ta' 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb

PROĊEDURA TAT-TEST

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

10. Is-sustanza kimika tat-test għandha tkun applikata fuq żona żgħira (madwar 6 cm^2) tal-ġilda u tinkesa b'kumpressa b'garża, li tinżamm fil-post bi stikk mhux irritanti. Fil-każi li fihom l-applikazzjoni diretta ma tkunx possibbli (eż. likwidi u ċerti pejsts), is-sustanza kimika tat-test l-ewwel għandha tkun applikata fuq kumpressa b'garża, li mbagħad tkun applikata fuq il-ġilda. Il-kumpressa għandha tinżamm f'kuntatt laxk mal-ġilda permezz ta' faxxa semiokklużiva adattata għad-durata tal-esponiment. Jekk is-sustanza kimika tat-test tkun applikata fuq il-kumpressa, din għandha titwaħħal mal-ġilda b'tali mod li jkun hemm kuntatt tajjeb u distribuzzjoni uniformi tas-sustanza kimika tat-test mal-ġilda. L-aċċess mill-annimal għall-kumpressa u l-inġestjoni jew it-teħid man-nifs tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu evitati.

11. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test ġeneralment jintużaw fi stat mhux dilwit. Meta jsiru t-testijiet ta' solidi (li jistgħu jitfarrku, jekk dan jitqies li jkun meħtieġ), is-sustanza kimika tat-test għandha tkun niedja b'ammont żgħir ilma (jew, meta meħtieġ, b'xi veikolu adattat ieħor) li jkun suffiċjenti biex jiżgura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Meta jintużaw veikoli oħra apparti l-ilma, l-influwenza potenzali tal-veikolu fuq l-irritazzjoni tal-ġilda mis-sustanza kimika tat-test għandha tkun minima, jekk tkun preżenti affattu.

12. Fit-tmiem tal-perjodu tal-esponiment, li normalment ikun ta' erba' sigħat, is-sustanza kimika tat-test residwa għandha titneħħa, fejn prattikabbli, bl-użu tal-ilma jew ta' xi solvent xieraq mingħajr ma jitbiddlu r-rispons eżistenti jew l-integrità tal-epidermis.

▼M8

Livell tad-doża

13. Doża ta' 0,5 ml likwidu jew 0,5 g solidu jew pejst tiġi applikata fiż-żona tat-test.

Test inizjali (Test *in vivo* għall-irritazzjoni/korrużjoni dermali bl-użu ta' annimal wieħed)

14. Meta sustanza kimika tat-test tiġi ġudikata bħala korrużiva, irritanti jew mhux klassifikata fuq il-bażi ta' analiżijiet tal-piż tal-evidenza jew ta' ttestjar *in vitro* preċedenti, normalment ma jkunx hemm bżonn ta' ttestjar *in vivo* ulterjuri. Madankollu, fil-każijiet li fihom id-*data* addizzjonali titqies ġustifikata, it-test *in vivo* għall-ewwel isir bl-użu ta' annimal wieħed u billi jiġi applikat l-approċċ segwenti. Sa tliet kumpressi tat-test jiġu applikati b'mod sekwenzjali fuq l-annimal. L-ewwel kumpressa titneħħa wara tliet minuti. Jekk ma tiġi osservata ebda reazzjoni serja tal-ġilda, tiġi applikata t-tieni kumpressa f'sit differenti u din titneħħa wara siegħa. Jekk l-osservazzjonijiet f'dan l-istadju jindikaw li l-esponiment jista' jitħalla b'mod uman għal erba' sigħat, tiġi applikata t-tielet kumpressa u din titneħħa wara erba' sigħat, u jiġi gradat ir-rispons.

15. Jekk effett korrossiv ikun osservat wara kwalunkwe wieħed mit-tliet esponimenti sekwenzali, it-test jiġi terminat minnufih. Jekk effett korrossiv ma jkunx osservat wara li titneħħa l-aħħar kumpressa, l-annimal ikun osservat għal 14-il jum, sakemm il-korrużjoni ma tkunx żviluppat f'xi punt aktar kmieni.

16. F'dawk il-każijiet li fihom is-sustanza kimika tat-test ma tkunx mistennija tipproduċi korrużjoni imma tista' tkun irritanti, għandha tiġi applikata kumpressa waħda fuq annimal wieħed għal erba' sigħat.

Test konfermatorju (Test *in vivo* għal irritazzjoni dermali b'annimali addizzjonali)

17. Jekk effett korrużiv ma jkunx osservat fit-test inizjali, l-irritant jew ir-rispons negattiv għandu jiġi kkonfermat bl-użu ta' massimu ta' żewġ annimali oħra, kull wieħed b'kumpressa waħda, għal perjodu ta' esponiment ta' erba' sigħat. Jekk effett irritanti jkun osservat fit-test inizjali, it-test konfermatorju jista' jitwettaq b'mod sekwenzali, jew bl-esponiment ta' żewġ annimali addizzjonali fl-istess ħin. Fil-każ eċċezzjonali li fih ma jsirx it-test inizjali, żewġ annimali jew tlieta jistgħu jiġu ttrattati b'kumpressa waħda, li titneħħa wara erba' sigħat. Meta jintużaw żewġ annimali, jekk it-tnejn li huma juru l-istess rispons, ma jkun meħtieġ isir ebda ttestjar ulterjuri. Inkella, jiġi ttestjat it-tielet annimal ukoll. Risponsi ekwivoċi ikunu jeħtieġu evalwazzjoni bl-użu ta' annimali addizzjonali.

Perjodu ta' osservazzjoni

18. Id-durata tal-perjodu ta' osservazzjoni għandha tkun suffiċjenti biex tkun evalwata bis-sħiħ ir-riversabbiltà tal-effetti osservati. Minkejja dan, l-esperiment għandu jiġi terminat fi kwalunkwe waqt jekk l-annimal juri sinjali kontinwi ta' uġigħ jew ta' tbatija serji. Biex ikunu determinati l-effetti tar-riversibbbiltà, l-annimali għandhom ikunu osservati sa 14-il jum wara t-tneħħija tal-kumpressi. Jekk ir-riversibbiltà tkun osservata qabel l-14-il jum, l-esperiment għandu jiġi terminat f'dak il-waqt.

Osservazzjonijiet kliniċi u l-iggradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda

19. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għal sinjali ta' eritema u ta' edema, u r-risponsi reġistrati wara 60 minuta, u mbagħad 24, 48 u 72 siegħa wara t-tneħħija tal-kumpressa. Għat-test inizjali fuq annimal wieħed, is-sit tat-test ikun ukoll eżaminat immedjatament wara li titneħħa l-kumpressa. Ir-reazzjonijiet dermali huma ggradati u rreġistrati skont il-gradi fit-Tabella ta' hawn taħt. Jekk ikun hemm ħsara fil-ġilda li ma tistax tiġi identifikata

▼M8

bħala irritazzjoni jew korrużjoni wara 72 siegħa, l-osservazzjonijiet jistgħu jkunu meħtieġa sal-jum 14 biex tkun determinata r-riversibbiltà tal-effetti. B'żieda mal-osservazzjonijiet tal-irritazzjoni, l-effetti tossiċi lokali kollha, bħal ma huma n-nuqqas ta' xaħam min taħt il-ġilda, u kwalunkwe effett sistematiku avvers (eż. l-effetti fuq sinjali kliniċi ta' tossiċità u l-piż tal-ġisem), għandhom ikunu deskritti bis-sħiħ u rreġistrati. L-eżami istopatoloġiku għandu jiġi kkunsidrat biex jiċċara risponsi ekwivoċi.

20. L-iggradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda bilfors li jkun soġġettiv. Biex tkun imħġeġġa l-armonizzazzjoni fl-iggradar tar-rispons tal-ġilda u biex ikunu megħjuna l-laboratorji tat-testijiet u dawk involuti fit-twettiq u fl-interpretazzjoni tal-osservazzjonijiet, il-persunal li jagħmel l-osservazzjonijiet irid ikun imħarreġ b'mod adegwat fis-sistema tal-iggradar użata (ara t-Tabella ta' hawn taħt). Gwida illustrata għall-iggradar tal-irritazzjoni tal-ġilda u ta' leżjonijiet oħra tista' tkun ta' għajnuna (3).

DATA U RAPPORTAR

21. Ir-riżultati tal-istudju għandhom ikunu miġbura f'forma tabulari fir-rapport tat-test finali u għandhom ikopru l-punti kollha elenkati fil-paragrafu 24.

Evalwazzjoni tar-riżultati

22. Il-punteġġi tal-irritazzjoni dermali għandhom ikunu evalwati flimkien man-natura u mas-severità tal-leżjonijiet, u mar-riversibbiltà jew mannuqqas ta' riversibbbiltà tagħhom. Il-punteġġi individwali ma jirrappreżentawx norma assoluta għall-propjetajiet irritanti ta' xi materjal, minħabba li jiġu evalwati wkoll effetti oħra tal-materjal tat-test. Minflok, il-punteġġi individwali għandhom jitqiesu bħala valuri referenzjarji, li jridu jkunu evalwati flimkien mal-osservazzjonijiet l-oħra kollha li jirriżultaw mill-istudju.

23. Ir-riversibbbiltà tal-leżjonijiet dermali wkoll għandha tkun ikkunsidrata fl-evalwazzjoni tar-risponsi irritanti. Meta r-risponsi bħalma huma l-alopeċja (żona limitata), l-iperkeratożi, l-iperplażja u l-esfoljazzjoni, jippersistu sa tmiem il-perjodu ta' 14-il jum osservazzjoni, is-sustanza kimika tat-test għandha titqies bħala irritant.

Rapport tat-test

24. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Il-ħsieb wara l-ittestjar in vivo:

— Analiżi tal-piż tal-evidenza tad-*data* preeżistenti tat-test, inklużi r-riżultati minn strateġija ta' ttestjar sekwenzjali;

— Deskrizzjoni tad-*data* rilevanti disponibbli mill-ittestjar preċedenti;

— *Data* miksuba f'kull stadju tal-istrateġija ta' ttestjar;

— Deskrizzjoni tat-testijiet *in vitro* mwettqa, inklużi d-dettalji tal-proċeduri, ir-riżultati miksuba bis-sustanzi tat-test/referenza;

— Analiżi tal-piż tal-evidenza għat-twettieq tal-istudju *in vivo*.

Sustanza kimika tat-test:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

▼**M8**

— Sustanza multikostitwenti, taħlita u sustanzi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti b'reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi (UVCB): ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tisħin, it-tħin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Il-veikolu:

— L-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (fejn xieraq), il-volum użat;

— Il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

L-annimal(i) tat-test:

— L-ispeċi/ir-razza użata, ir-raġuni wara l-użu ta' annimal(i) li mhuwiex fenek albino;

— In-numru tal-annimal(i) għal kull sess;

— Il-piż(ijiet) tal-annimali individwali, kemm fil-bidu kif ukoll fil-konklużjoni tat-test;

— L-età fil-bidu tal-istudju;

— Is-sors tal-annimal(i), il-kundizzjonijiet tal-abitazzjoni, id-dieta, eċċ.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— It-teknika tal-preparazzjoni tas-sit tal-kumpressa;

— Id-dettalji dwar il-materjali tal-kumpressa użati u t-teknika tal-kumpressa;

— Id-dettalji dwar il-preparazzjoni, l-applikazzjoni u t-tneħħija tas-sustanza kimika tat-test.

Ir-riżultati:

— Tabulazzjoni tal-punteġġi tar-rispons/korrużjoni għal kull annimal fil-punti kollha tal-ħin imkejla;

— Id-deskrizzjonijiet tal-leżjonijiet kollha, kif osservati;

— Id-deskrizzjoni narrattiva tan-natura u l-grad tal-irritazzjoni jew tal-korrużjoni osservati, u kwalunkwe sejba istopatoloġika;

— Id-deskrizzjoni ta' effetti avversi lokali (eż. tneħħija tax-xaħam minn taħt il-ġilda) u sistematiċi oħra minbarra l-irritazzjoni jew il-korrużjoni dermali.

▼**M8**

Diskussjoni dwar ir-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, kif approvata mit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat tas-Sustanzi Kimiċi u tal-Grupp ta' Ħidma dwar is-Sustanzi Kimiċi, Novembru 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼**M8**

Tabela

Iggradar tar-reazzjonijiet tal-?ilda

Formazzjoni ta' Eritema u ta' Eskara

Ebda eritema	0
Eritema ħafifa ħafna (kemm kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura tal-laħam) sa formazzjoni ta' eskara li tipprevjeni l-iggradar tal-eritema	4

Il-massimu possibbli: 4

Il-Formazzjoni ta Edema

Ebda edema	0
Edema ħafifa ħafna (kemm kemm tidher)	1
Edema ħafifa (il-ġnub taż-żona huma definiti sew b'neħħiet definiti)	2
Edema moderata (neħħa ta' madwar 1 mm)	3
Edema severa (neħħa akbar minn 1 mm u tifrix lil hinn miż-żona tal-esponiment)	4

Il-massimu possibbli: 4

L-eżami istopatoloġiku għandu jitwettaq biex jiċċara risponsi ekwivoċi.

▼**M8**

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika hi sustanza jew taħlita.

Irritazzjoni dermali hi l-produzzjoni ta' ħsara riversibbli fil-ġilda wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat.

Korrużjoni dermali hi l-produzzjoni ta' ħsara irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrożi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minħabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopeċja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom ikun hemm dubju.

Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M7

B.5. **IRRITAZZJONI AKUTA TAL-GĦAJNEJN/KORRUŻJONI**

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 405 tal-OECD (2012). Il-linji gwida tat-test tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi jiġu riveduti kull ċertu żmien sabiex jiġi żgurat li dawn jirriflettu l-aħjar xjenza disponibbli. Fir-reviżjonijiet preċedenti ta' din il-linja gwida tat-test, inxteħtet attenzjoni speċjali fuq it-titjib permezz tal-evalwazzjoni tal-informazzjoni eżistenti kollha dwar is-sustanza kimika tat-test sabiex ikunu evitati testijiet żejda fuq l-annimali tal-laboratorju u b'hekk jiġi indirizzat it-tħassib dwar it-trattament xieraq tal-annimali. TG 405 (adottata fl-1981 u aġġornata fl-1987, l-2002, u l-2012) tinkludi r-rakkomandazzjoni li qabel ma jitwettaq it-test *in vivo* deskritt għal irritazzjoni akuta tal-għajnejn/korrużjoni, għandha ssir analiżi tal-piż tal-evidenza (1) fuq id-dejta rilevanti eżistenti. Meta ma jkunx hemm biżżejjed dejta disponibbli, huwa rakkomandat li dawn jiġu żviluppati bl-applikazzjoni ta' testijiet sekwenzali (2) (3). L-istrateġija tat-testijiet tinkludi t-twettieq ta' testijiet *in vitro* vvalidati u aċċettabbli u hija pprovduta bħala suppliment għal dan il-metodu ta' ttestjar. Għall-fini tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH) ([1]), strateġija ta' ttestjar integrata hija inkluża fil-Gwida tal-ECHA rilevanti wkoll (21). L-ittestjar fl-annimali għandu jsir biss jekk jiġi stabbilit li dan huwa neċessarju wara li jiġu kkunsidrati l-metodi alternattivi disponibbli, u l-użu ta' dan jitqies xieraq. F'dan iż-żmien li fih qiegħed jiġi abbozzat dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat, hemm każijiet li fihom l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għadu neċessarju jew meħtieġ minn ċerti oqfsa regolatorji.

L-aħħar aġġornament iffoka l-iktar fuq l-użu ta' analġeżiċi u anestetiċi mingħajr ma jitħalla impatt fuq il-kunċett u l-istruttura bażiċi tal-linja gwida tat-test. ICCVAM ([2]) u bord xjentifiku internazzjonali indipendenti ta' evalwazzjoni bejn il-pari rrevedew l-utilità u l-limitazzjonijiet tal-użu spiss ta' anestetiċi topiċi, analġeżiċi sistemiċi u punti ta' tmiem umanitarji matul l-ittestjar *in vivo* tas-sikurezza tal-irritazzjoni okulari (12). Ir-reviżjoni kkonkludiet li l-użu ta' anestetiċi topiċi u analġeżiċi sistemiċi jista' jevita ħafna mill-uġigħ u t-tbatija jew kull uġigħ u tbatija bla ma jaffettwa l-eżitu tat-test, u rrakkomandat li dawn is-sustanzi jintużaw dejjem. Dan il-metodu ta' ttestjar jieħu f'kunsiderazzjoni din ir-reviżjoni. Anestetiċi topiċi, analġeżiċi sistemiċi, u punti ta' tmiem umanitarji għandhom jintużaw ta' spiss matul l-ittestjar *in vivo* tal-korrużjoni u l-irritazzjoni akuta tal-għajnejn. L-eċċezzjonijiet għall-użu tagħhom għandhom ikunu ġġustifikati. L-irfinamenti deskritti f'dan il-metodu sejrin inaqqsu b'mod sostanzjali jew jevitaw l-uġigħ u t-tbatija tal-annimali f'ħafna mis-sitwazzjonijiet ta' ttestjar fejn ikun għad hemm bżonn li jsir ittestjar *in vivo* tas-sikurezza okulari.

L-immaniġġjar preventiv ibbilanċjat tal-uġigħ għandu jinkludi (i) pretrattament ta' rutina b'anestetiku topiku (eż. proparacaine jew tetracaine) u analġeżiku sistemiku (eż. buprenorphine), (ii) skeda ta' rutina ta' wara t-trattament tal-analġeżija sistemika (eż. buprenorphine u meloxicam), (iii) osservazzjoni, monitoraġġ u reġistrazzjoni skedati tal-annimali għal sinjali kliniċi ta' uġigħ u/jew tbatija, u (iv) osservazzjoni, monitoraġġ u reġistrazzjoni skedati tal-għamla, is-severità u l-progressjoni ta' kull korriment marbut mal-għajnejn. Huma pprovduti iktar dettalji

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni. ĠU L 304, 22.11.2007, p. 1

([2]) The US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

▼M7

fil-proċeduri aġġornati deskritti iktar 'il quddiem. Wara l-għoti tas-sustanza kimika tat-test, ma għandu jiġi applikat l-ebda anestetiku jew analġeżiku topiku addizzjonali sabiex tiġi evitata interferenza mal-istudju. L-analġeżiċi b'attività antiinfjammatorja (eż. meloxicam) ma għandhomx jiġu applikati b'mod topiku, u d-dożi użati b'mod sistemiku ma għandhomx jinterferixxu ma' effetti okulari.

Id-definizzjonijiet huma stabbiliti fl-Appendiċi għall-metodu ta' ttestjar.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

Fl-interess kemm ta' xjenza għaqlija kif ukoll tat-trattament xieraq tal-annimali, testijiet *in vivo* ma għandhomx jiġu kkunsidrati qabel ma tkun ġiet evalwata d-dejta disponibbli kollha rilevanti għall-potenzjal ta' korrużjoni/irritazzjoni tal-għajnejn mis-sustanza f'analiżi tal-piż tal-evidenza. Tali dejta għandha tinkludi evidenza minn studji eżistenti kemm fuq il-bnedmin u/jew l-annimali tal-laboratorju, l-evidenza ta' korrużjoni/irritazzjoni ta' sustanza jew taħlita waħda jew iktar strutturalment relatata, id-dejta li turi aċidità jew alkalinità qawwija tas-sustanza kimika (4) (5), u r-riżultati minn testijiet *in vitro* jew *ex vivo* vvalidati u aċċettati għall-korrużjoni tal-ġilda u l-korrużjoni/irritazzjoni tal-għajnejn (6) (13) (14) (15) (16) (17). L-istudji setgħu ġew konklużi qabel l-analiżi tal-piż tal-evidenza, jew bħala riżultat tagħha.

Għal ċerti sustanzi kimiċi, tali analiżi tista' tindika l-ħtieġa għal studji *in vivo* dwar il-potenzjal tas-sustanza kimika għal korrużjoni/irritazzjoni okulari. F'dawn il-każijiet kollha, qabel ma jiġi kkunsidrat l-użu tat-test *in vivo* tal-għajnejn, idealment l-ewwel għandu jsir u jiġi evalwat studju tal-effetti *in vitro* u/jew *in vivo* ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanza kimika skont l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali fil-metodu ta' ttestjar B.4 (7) jew l-istrateġija ta' ttestjar integrat deskritta fil-Gwida tal-ECHA (21).

Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali, li tinkludi t-twettiq ta' testijiet validati *in vitro* jew *ex vivo* tal-korrużjoni/irritazzjoni tal-għajnejn, hija inkluża bħala Suppliment għal dan il-metodu ta' ttestjar u, għall-fini tar-REACH, fil-Gwida tal-ECHA (21). Huwa rakkomandat li din l-istrateġija ta' ttestjar tkun segwita qabel ma jinbdew it-testijiet *in vivo*. Għal sustanzi kimiċi ġodda, huwa rakkomandat approċċ gradwali ta' ttestjar għall-iżvilupp ta' dejta xjentifikament solida fuq il-korrużjoni/irritazzjoni tas-sustanza kimika. Għal sustanzi kimiċi eżistenti b'dejta mhux suffiċjenti dwar il-korrużjoni/irritazzjoni tal-ġilda u l-għajnejn, l-istrateġija tista' tintuża sabiex timla l-vojt fin-nuqqas ta' dejta. L-użu ta' strateġija jew proċedura ta' ttestjar differenti, jew id-deċiżjoni li ma jintużax approċċ gradwali ta' ttestjar, għandhom ikunu ġustifikati.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST *IN VIVO*

Wara pretrattament b'analġeżiku sistemiku u l-induzzjoni ta' anestezija topika xierqa, is-sustanza kimika li trid tiġi ttestjata hija applikata f'doża waħda għal waħda mill-għajnejn tal-annimal tal-esperiment; l-għajn mhux trattata isservi bħala l-kontroll. Il-grad tal-irritazzjoni/korrużjoni tal-għajn huwa evalwat billi jiġu kklassifikati l-leżjonijiet tal-konġuntiva, tal-kornea u tal-iris, f'intervalli speċifiċi. Effetti oħrajn fl-għajn u l-effetti sistemiċi avversi huma deskritti wkoll sabiex jipprovdu evalwazzjoni sħiħa tal-effetti. It-tul ta' żmien tal-istudju għandu jkun biżżejjed sabiex tkun evalwata r-reversibilità jew l-irreversibilità tal-effetti.

Annimali li juru sinjali ta' tbatija u/jew uġigħ severi fi kwalunkwe stadju tat-test jew leżjonijiet konsistenti mal-punti ta' tmiem umanitarji deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar (ara l-Paragrafu 26) għandhom jinqatlu b'mod umanitarju, u s-sustanza kimika għandha tiġi vvalutata kif xieraq. Il-kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni sabiex jinqatlu b'mod umanitarju annimali fi stat ta' agunija jew tbatija severa huma spjegati f'dokument ta' Gwida tal-OECD (8).

▼M7

IL-PREPARAMENTI GĦAT-TEST *IN VIVO*

L-għażla tal-ispeċijiet

Il-fenek albino huwa l-annimal tal-laboratorju preferut, u jintużaw annimali adulti żgħażagħ b'saħħithom. Għandha tingħata raġuni għall-użu ta' razez jew speċijiet oħrajn.

Preparazzjoni tal-annimali

Iż-żewġ għajnejn ta' kull annimal sperimentali magħżul b'mod provviżorju għat-testijiet għandhom ikunu eżaminati fi żmien 24 siegħa qabel ma jibda t-test. Ma għandhomx jintużaw annimali li juru irritazzjoni fl-għajnejn, difetti okulari, jew li korriment korneali preeżistenti.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf

L-annimali għandhom jinżammu f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 20 °C (± 3 °C) għall-fniek. Filwaqt li l-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas ta' 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għandha tiġi evitata intensità eċċessiva tad-dawl. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

PROĊEDURA TAT-TEST

L-użu ta' anestetiċi topiċi u analġeżiċi sistemiċi

Huma rakkomandati l-proċeduri li ġejjin sabiex jiġu evitati jew minimizzati l-uġigħ u t-tbatija fil-proċeduri ta' ttestjar tas-sikurezza okulari. Minflok, jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi li ġew stabbiliti li jipprovdu evitar jew tnaqqis ekwivalenti jew aħjar tal-uġigħ u t-tbatija.

— Sittin minuta qabel l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (TCA), tingħata buprenorfina 0.01 mg/kg permezz ta' injezzjoni taħt il-ġilda (SC) sabiex tipprovdi livell terapewtiku ta' analġeżija sistemika. Mhuwiex magħruf jew mistenni li buprenorfina u analġeżiċi opojdi simili oħrajn mogħtijin sistemikament jibdlu r-risponsi okulari (12).

— Ħames minuti qabel it-TCA, tiġi applikata taqtira waħda jew tnejn ta' anestetiku okulari topiku (eż. 0.5 % kloridrat tal-proparacaine jew 0.5 % kloridrat tat-tetracaine) fuq kull għajn. Sabiex tiġi evitata l-interferenza possibbli mal-istudju, huwa rakkomandat anestetiku topiku li ma fihx preservattivi. L-għajn ta' kull annimal li mhijiex ittrattata b'sustanza kimika tat-test, iżda li hija ttrattata b'anestetiċi topiċi, isservi ta' kontroll. Jekk jiġi antiċipat li s-sustanza kimika tat-test tikkawża uġigħ u tbatija sinifikanti, normalment mhux suppost tiġi ttestjata *in vivo*. Madankollu, f'każ ta' dubju jew meta jkun hemm bżonn li jsir hekk, għandhom jiġu kkunsidrati l-applikazzjonijiet addizzjonali tal-anestetiku topiku f'intervalli ta' 5 minuti qabel it-TCA. L-utenti għandhom ikunu jafu li bosta applikazzjonijiet ta' anestetiċi topiċi jistgħu potenzjalment jikkaġunaw żieda ħafifa fis-severità u/jew iż-żmien meħtieġ sabiex jgħibu leżjonijiet indotti kimikament.

— sigħat wara t-TCA, jingħataw buprenorfina 0.01 mg/kg SC u meloxicam 0.5 mg/kg SC sabiex jipprovdu livell terapewtiku kontinwu ta' analġeżija sistemika. Filwaqt li ma hemm l-ebda dejta li tissuġġerixxi li meloxican għandu effetti antiinfjammatorji fuq l-għajn meta jingħata SC darba kuljum, meloxicam ma għandux jingħata sa tal-inqas 8 sigħat wara t-TCA sabiex tiġi evitata kwalunkwe interferenza possibbli mal-istudju (12).

— Wara t-trattament inizjali ta' 8 sigħat wara t-TCA, buprenorfina 0.01 mg/kg SC għandha tingħata kull 12-il siegħa, flimkien ma' meloxicam 0.5 mg/kg SC

▼M7

kull 24 siegħa, sakemm jitilqu l-leżjonijiet okulari u ma jifdal ebda sinjal kliniku ta' uġigħ jew tbatija. Hemm disponibbli preparamenti għar-rilaxx sostnut ta' analġeżiċi li jistgħu jiġu kkunsidrati sabiex inaqqsu l-frekwenza tad-dożaġġ tal-analġeżiku.

— Analġeżija "ta' salvataġġ" għandha tingħata minnufih wara t-TCA jekk l-analġeżija preventiva u l-anesteżija topika ma jkunux adegwati. Jekk annimal juri sinjali ta' uġigħ u tbatija matul l-istudju, tingħata minnufih doża "ta' salvataġġ" ta' buprenorfina 0.03 mg/kg SC u din tiġi ripetuta bi frekwenza massima ta' kull 8 sigħat, jekk ikun hemm bżonn, minflok iż-0.01 mg/kg SC kull 12-il siegħa. Imbagħad meloxicam 0.5 mg/kg SC jingħata kull 24 siegħa flimkien mad-doża "ta' salvataġġ" ta' buprenorfina, iżda mhux sa tal-inqas 8 sigħat wara t-TCA.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Is-sustanza kimika tat-test għandha titqiegħed fil-ħofra konġuntivali ta' waħda mill-għajnejn ta' kull annimal wara li l-kappell t'isfel tal-għajn jinġibed bil-galbu lil hinn mill-boċċa tal-għajn. Imbagħad il-kpiepel jinżammu bil-galbu magħluqin għal madwar sekonda sabiex jiġi evitat it-telf tal-materjal. L-għajn l-oħra, li tibqa' mingħajr trattament, isservi ta' kontroll.

Irrigazzjoni

L-għajnejn tal-annimali tat-test ma għandhomx jinħaslu għal tal-inqas 24 siegħa wara l-instillazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, ħlief għas-solidi (ara l-paragrafu 18), u fil-każ ta' effetti korrużivi jew irritanti immedjati. Wara 24 siegħa, tista' ssir tlaħliħa sewwa jekk jitqies li din hija xierqa.

L-użu ta' grupp satellita ta' annimali għall-investigazzjoni tal-infuwenza tal-ħasil mhuwiex rakkommandat, sakemm ma jkunx xjetifikament ġustifikat. Jekk ikun meħtieġ grupp satellita, għandhom jintużaw żewġt ifniek. Il-kundizzjonijiet tal-ħasil għandhom ikunu dokumentati bir-reqqa, eż. il-ħin tal-ħasil; il-kompożizzjoni u t-temperatura tas-soluzzjoni tal-ħasil; id-durata, il-volum u l-veloċità tal-applikazzjoni.

Livell tad-doża

(1) ***L-ittestjar tal-likwidi***

Għat-testijiet tal-likwidi, tintuża doża ta' 0.1 ml. Ma għandhomx jintużaw sprejs bil-pompa għall-instillazzjoni diretta tas-sustanza kimika fl-għajn. L-isprej tal-likwidu għandu jitneħħa u jinġabar f'kontenitur qabel l-instillazzjoni ta' 0,1 ml fl-għajn.

(2) ***L-ittestjar tas-solidi***

Meta jsiru t-testijiet ta' solidi, pejsts, u sustanzi partikolati, l-ammont użat għandu jkollu volum ta' 0.1 ml jew piż ta' mhux aktar minn 100 mg. Is-sustanza kimika tat-test għandha tkun mitħuna fi trab fin. Il-volum tal-materjal solidu għandu jitkejjel wara li jkun kumpattat b'ġentilezza, eż. b'taptip fuq il-kontenitur tal-kejl. Jekk is-sustanza kimika solida tat-test ma tkunx tneħħiet mill-għajn tal-annimal tat-test b'mekkaniżmi fiżjoloġiċi fl-ewwel punt tal-ħin tal-osserazzjoni ta' siegħa wara t-trattament, l-għajn tista' titlaħlaħ b'ilma salin jew distillat.

(3) ***L-ittestjar ta' aerosoli***

Huwa rakkommandat li l-isprejs bil-pompa u l-aerosoli kollha jinġabru qabel l-instillazzjoni fl-għajn. L-unika eċċezzjoni hija għas-sustanzi kimiċi f'kontenituri tal-aerosoli b'pressjoni għolja, li ma jistgħux jinġabru minħabba l-vaporizzazzjoni. F'dawn il-każijiet, l-għajn għandha tinżamm miftuħa, u s-sustanza kimika tat-test tingħata fl-għajn f'tagħfisa sempliċi ta' madwar sekonda, minn distanza ta' 10 cm direttament quddiem l-għajn. Din id-distanza tista' tvarja jiddependi mill-pressjoni tal-isprej u l-kontenuti tiegħu. Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma ssirx ħsara lill-għajn mill-pressjoni tal-isprej. F'każijiet xierqa, jista' jkun hemm il-ħtieġa li jkun evalutat il-potenzjal ta' ħsara "mekkanika" tal-għajn mill-qawwa tal-isprej.

▼M7

Tista' tinħareġ stima tad-doża minn aerosol billi t-test jiġi ssimulat kif ġej: is-sustanza kimika tiġi sprejjata fuq karta tal-użin minn feħa d-daqs ta' għajn ta' fenek imqiegħda direttament quddiem il-karta. Iż-żieda fil-piż tal-karta tintuża sabiex jiġi kkalkolat l-ammont sprejjat fl-għajn. Għal sustanzi kimiċi volatili, id-doża tista' tkun ikkalkolata bl-użin ta' kontenitur riċevitur qabel u wara t-tneħħija tas-sustanza kimika tat-test.

It-test inizjali (test in vivo tal-irritazzjoni/korrużjoni tal-għajn bl-użu ta' annimal wieħed)

Huwa ferm rakkomandat li t-test *in vivo* jsir inizjalment bl-użu ta' annimal wieħed (ara s-Suppliment għal dan il-metodu ta' ttestjar: Strateġija ta' Ttestjar Sekwenzali għall-Irritazzjoni u l-Korrużjoni tal-Għajnejn). L-osservazzjonijiet għandhom jippermettu li jiġu stabbiliti s-severità u r-reversibilità qabel ma jsir it-test konfermatorju f'annimal ieħor.

Jekk ir-riżultati ta' dan it-test jindikaw li s-sustanza kimika tkun korrużiva jew severament irritanti għall-għajn bl-użu tal-proċedura deskritta, ma għandhomx isiru aktar testiet dwar l-irritazzjoni okulari.

Test konfermatorju (test *in vivo* tal-irritazzjoni tal-għajn b'annimali addizzjonali)

Jekk ma jkunx osservat effett korrużiv jew irritanti severament fit-test inizjali, ir-rispons irritanti jew negattiv għandu jiġi kkonfermat bl-użu ta' massimu ta' żewġ annimali addizzjonali. Jekk jiġi osservat effett irritanti fit-test inizjali, huwa rakkomandat li t-test konfermatorju jsir b'mod sekwenzjali f'annimal wieħed wara l-ieħor, minflok ma jiġu esposti żewġ annimali addizzjonali fl-istess ħin. Jekk it-tieni annimal juri effetti korrużivi jew irritanti severi, it-test m'għandux jitkompla. Jekk ir-riżultati mit-tieni annimal ikunu biżżejjed sabiex jippermettu li tiġi stabbilita klassifikazzjoni tal-periklu, ma għandu jsir ebda test ieħor.

Perjodu ta' osservazzjoni

Id-durata tal-perjodu ta' osservazzjoni għandha tkun biżżejjed sabiex ikunu evalwati l-kobor u r-reversibilità tal-effetti osservati. Madankollu, l-esperiment għandu jkun terminat fi kwalunkwe ħin jekk l-annimal juri sinjali kontinwi ta' uġigħ jew tbatija severi (8). Sabiex tkun stabbilita r-reversibilità tal-effetti, l-annimali għandhom ikunu osservati normalment għal 21 jum wara l-amministrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Jekk ir-reversibilità tidher qabel 21 jum, l-esperiment għandu jkun terminat f'dak il-waqt.

Osservazzjonijiet kliniċi u l-iggradar tar-reazzjonijiet tal-għajn

L-għajnejn għandhom jiġu evalwati b'mod komprensiv għall-preżenza jew l-assenza ta' leżjonijiet okulari sieħa wara t-TCA, segwita minn evalwazzjonijiet li tal-inqas isiru ta' kuljum. L-annimali għandhom jiġu evalwati bosta drabi kuljum għall-ewwel 3 ijiem sabiex jiġi żgurat li d-deċiżjonijiet dwar it-terminazzjoni jittieħdu fil-ħin. L-annimali tat-test għandhom jiġu evalwati b'rutina għad-durata sħiħa tal-istudju għal sinjali kliniċi ta' uġigħ u/jew tbatija (eż. mess jew ħakk ripetut tal-għajn, teptip eċċessiv tal-għajnejn, dmugħ eċċessiv) (9) (10) (11) tal-inqas darbtejn kuljum, b'tal-inqas 6 sigħat bejn l-osservazzjonijiet, jew iktar spiss jekk ikun hemm bżonn. Dan huwa neċessarju sabiex (i) l-annimali jiġu

▼M7

vvalutati b'mod adegwat għal evidenza ta' uġigħ u tbatija sabiex jittieħdu deċiżjonijiet informati fuq il-ħtieġa li jiżdied id-dożaġġ tal-analġeżiċi u (ii) l-annimali jiġu vvalutati għal evidenza ta' punti ta' tmiem umanitarji stabbiliti sabiex jittieħdu deċiżjonijiet informati dwar jekk huwiex xieraq li l-annimali jingħataw ewtanażija umanitarja, u sabiex jiġi żgurat li t-tali deċiżjonijiet jittieħdu fil-ħin. It-tilwin bil-fluworexxeina għandu jintuża ta' spiss u għandu jintuża bijomikroskopju korneali meta jitqies li dan huwa xiearq (eż. għall-valutazzjoni tal-fond tal-korriment meta jkun hemm ulċerazzjoni korneali) bħala għajnuna fid-detezzjoni u l-kejl tal-ħsara okulari, u sabiex jiġi evalwat jekk intlaħqux il-kriterji tal-punt ta' tmiem stabbiliti għall-ewtanażja umanitarja. Jistgħu jingabru ritratti diġitali tal-leżjonijiet osservati għal referenza u sabiex jiġi pprovdut rekord permanenti tal-firxa ta' ħsara okulari. L-annimali għandhom jinżammu fit-test mhux aktar milli meħtieġ ladarba tinkiseb l-informazzjoni definita. L-annimali li juru uġigħ jew tbatija severi għandhom jinqatlu b'mod umanitarju mingħajr dewmien, u s-sustanza kimika għandha tiġi vvalutata kif xieraq.

L-annimali bil-leżjonijiet tal-għajnejn li ġejjin wara l-instillazzjoni għandhom jinqatlu b'mod umanitarju (irreferi għat-Tabella 1 għal deskrizzjoni tal-gradi tal-leżjonijiet): perforazzjoni korneali jew ulċerazzjoni korneali sinifikanti inkluża stafiloma; demm fil-kompartiment anterjuri tal-għajn; opaċità korneali tal-grad 4; assenza ta' rifless tad-dawl (grad 2 tar-rispons iridjali) li tippersisti għal 72 siegħa; ulċerazzjoni tal-membrana konġuntivali; nekroži tal-membrana konġuntivali jew nittitanti; jew tqaxxir. Dan għaliex, ġeneralment, tali leżjonijiet ma jkunux reversibbli. Barra minn hekk, huwa rakkomandat li l-leżjonijiet okulari li ġejjin jistgħu jintużaw bħala punti ta' tmiem umanitarji sabiex jiġu terminati l-istudji qabel tmiem il-perjodu ta' osservazzjoni skedat ta' 21 jum. Dawn il-leżjonijiet jitqiesu bħala prekursuri ta' korrimenti irritanti jew korrużivi u korrimenti li mhumiex mistennijin li jitilqu sa tmiem il-perjodu ta' osservazzjoni ta' 21 jum: fond sever tal-korriment (eż. ulċerazzjoni korneali li testendi lil hinn mis-saffi superfiċjali tal-istroma), qerda tal-limbus > 50 % (kif evidenzjata minn tibjid tat-tessut konġuntivali), u infezzjoni severa tal-għajn (nixxija purulenti). Taħlita ta': vaskularizzazzjoni tal-wiċċ tal-kornea (jiġifieri pannu korneali); żona ta' tilwin bil-fluworexxeina li ma tonqosx maż-żmien skont valutazzjoni li ssir kuljum; u/jew nuqqas ta' riefiteljalizzazzjoni 5 ijiem wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jitqiesu wkoll bħala kriterji potenzjalment siewja li jinfluwenzaw id-deċiżjoni klinika dwar it-terminazzjoni bikrija tal-istudju. Madankollu, dawn is-sejbiet waħedhom mhumiex biżżejjed sabiex jiġġustifikaw terminazzjoni bikrija tal-istudju. Ladarba jkunu ġew identifikati effetti okulari severi, għandu jiġi kkonsultat veterinarju tal-annimali tal-laboratorju inkarigat jew ikkwalifikat jew persunal imħarreġ sabiex jidentifika l-leżjonijiet kliniċi għal eżami kliniku sabiex jistabbilixxi jekk it-taħlita ta' dawn l-effetti jiġġustifikax terminazzjoni bikrija tal-istudju. Il-gradi ta' reazzjoni okulari (konġuntivi, kornea u iris) għandhom jinkisbu u jiġu rreġistrati wara siegħa, 24, 48 u 72 siegħa wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (Tabella 1). L-annimali li ma jiżviluppawx leżjonijiet okulari jistgħu jiġu terminati mhux aktar qabel 3 ijiem wara l-instillazzjoni. L-annimali b'leżjonijiet okulari li mhumiex severi għandhom ikunu osservati sakemm ifiqu l-leżjonijiet, jew għal 21 jum, f'liema waqt l-istudju jkun terminat. L-osservazzjonijiet għandhom isiru u jiġu rreġistrati f'tal-inqas siegħa, 24 siegħa, 48 siegħa, 72 siegħa, 7 ijiem, 14-il jum, u 21 jum sabiex jiġi stabbilit l-istatus tal-leżjonijiet, u r-reversibilità jew l-irreversibilità tagħhom. Għandhom isiru osservazzjonijiet iktar frekwenti jekk ikun hemm bżonn sabiex jiġi stabbilit jekk l-annimal tat-test għandux jiġi ewtanizzat minħabba kunsiderazzjonijiet umanitarji jew jitneħħiex mill-istudju minħabba riżultati negattivi

Il-gradi tal-leżjonijiet okulari (Tabella 1) għandhom jiġu rreġistrati f'kull eżami. Kwalunkwe leżjoni oħra fl-għajn (eż. pannu korneali, tilwin, bidliet fil-kompatiment anterjuri) jew effett sistemiku avvers għandhom jiġu rrapportati wkoll.

L-eżami tar-reazzjonijiet jista' jkun iffaċilitat bl-użu tal-loupe binokulari, lampa tal-ferq tal-id, bijomikroskopju, jew xi apparat xieraq ieħor. Wara r-reġistrazzjoni tal-osservazzjonijiet wara 24 siegħa, l-għajnejn jistgħu jerġgħu jiġu eżaminati bl-għajnuna tal-fluworexxeina.

L-iggradar tar-risponsi okulari huwa neċċessarjament suġġettiv. Sabiex tkun imħeġġa l-armonizzazzjoni fl-iggradar tar-rispons okulari u sabiex ikunu megħjuna l-laboratorji tat-testijiet u dawk involuti fit-twettiq tall-osservazzjonijiet u tal-interpretazzjoni tagħhom, il-persunal li jwettaq l-osservazzjonijiet irid ikun imħarreġ b'mod adegwat fis-sistema tal-punteġġ użata.

▼M7

DEJTA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tar-riżultati

Il-klassifikazzjonijiet tal-irritazzjoni okulari għandhom jiġu evalwati b'konnessjoni man-natura u s-severità tal-leżjonijiet, u r-reversibilità jew in-nuqqas ta' reversibilità tagħhom. Il-klassifikazzjonijiet individwali ma jirrapreżentawx standard assolut għall-proprjetajiet irritanti ta' sustanza kimika, minħabba li jiġu evalwati effetti oħrajn tas-sustanza kimika tat-test ukoll. Minflok, il-klassifikazzjonijiet individwali għandhom jitqiesu bħala valuri ta' referenza u jagħmlu sens biss meta jkunu sostnuti b'deskrizzjoni sħiħa u evalwazzjoni tal-osservazzjonijiet kollha.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Il-ħsieb wara l-ittestjar in vivo: il-piż tal-evidenza ta' dejta preeżistenti tat-testijiet, inklużi r-riżultati minn strateġija ta' ttestjar sekwenzali:

— deskrizzjoni tad-dejta rilevanti disponibbli minn testijiet preċedenti;

— dejta miksuba f'kull stadju tal-istrateġija ta' ttestjar;

— deskrizzjoni tat-testijiet in vitro mwettqin, inklużi d-dettalji tal-proċeduri, ir-riżultati miksubin bis-sustanzi kimiċi ta' referenza/tat-test;

— deskrizzjoni tal-istudju *in vivo* dwar l-irritazzjoni/korrużjoni dermali li jkun sar, inklużi r-riżultati miksubin;

— analiżi tal-piż tal-evidenza għat-twettieq tal-istudju *in vivo*.

Sustanza kimika tat-test:

— dejta ta' identifikazzjoni (eż. isem is-sustanza u, jekk disponibbli, in-numru CAS, il-purità, l-impuritajiet magħrufin, is-sors, in-numru tal-lott);

— in-natura fiżika u l-propjetajiet fiżikokimiċi (eż. il-pH, il-volatilità, is-solubilità, l-istabilità, ir-reattività mal-ilma);

— fil-każ ta' taħlita, il-komponenti għandhom jiġu identifikati inkluża d-dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kostitwenti (eż. l-ismijiet tas-sustanzi kimiċi u, jekk disponibbli, in-numri tas-CAS) u l-konċentrazzjonijiet tagħhom;

— id-doża applikata.

Il-veikolu:

— l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (meta xieraq), il-volum użat;

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

L-annimali tat-test:

— l-ispeċijiet/ir-razza użati, ir-raġuni wara l-użu ta' annimali oħrajn u mhux fniek albino;

— l-età ta' kull annimal fil-bidu tal-istudju;

— in-numru ta' annimali ta' kull sess użati fit-test u fil-gruppi ta' kontroll (jekk meħtieġ);

— il-piżijiet tal-annimali individwali, kemm fil-bidu kif ukoll fil-konklużjoni tat-test;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.

▼M7

L-anestetiċi u l-analġeżiċi

— id-doża u l-ħinijiet ta' meta ngħataw l-anestetiċi topiċi u l-analġeżiċi sistemiċi;

— jekk jintuża anestetiku lokali, l-identifikazzjoni, il-purità, it-tip, id-doża, u l-interazzjoni potenzjali mas-sustanza kimika tat-test.

Ir-riżultati:

— id-deskrizzjoni tal-metodu użat sabiex jingħata punteġġ lill-irritazzjoni f'kull ħin tal-osservazzjoni (eż. lampa tal-ferq tal-id, bijomikroskopju, fluworexxeina);

— it-tqegħid f'tabella tad-dejta dwar ir-rispons irritanti/korrużiv għal kull annimali f'kull ħin ta' osservazzjoni jew sat-tneħħija ta' kull animal mit-test;

— id-deskrizzjoni narrattiva tal-grad u n-natura tal-irritazzjoni jew tal-korrożjoni osservata;

— id-deskrizzjoni ta' kwalunkwe leżjoni oħra osservata fl-għajn (eż. vaskularizzazzjoni, formazzjoni tal-pannu korneali, aderenzi, tilwin);

— id-deskrizzjoni tal-effetti avversi sistemiċi u lokali mhux okulari, reġistrazzjoni tas-sinjali kliniċi tal-uġigħ u t-tbatija, ritratti diġitali, u sejbiet istopatoloġiċi, jekk ikun hemm.

Diskussjoni dwar ir-riżultati

Interpretazzjoni tar-riżultati

L-estrapolazzjoni tar-riżultati tal-istudji dwar l-irritazzjoni tal-għajn fl-annimali tal-laboratorju għall-bnedmin hija valida biss sa ċertu punt limitat. F'ħafna każijiet, il-fenek albino huwa iktar sensittiv mill-bnedmin għal irritanti jew korrużivi okulari.

Għandha tingħata attenzjoni għall-interpretazzjoni tad-dejta sabiex tkun eskluża irritazzjoni li tirriżulta minn infezzjoni sekondarja.

TAGĦRIF

(1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 — 429.

(2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 — 164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 — 26.

(5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 — 231.

(6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, pp.483 — 524.

(7) Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, *Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness*.

▼M7

(8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, *Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test tar-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER)*.

(14) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, *Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test Mudell tal-Ġilda tal-Bniedem*.

(15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

(16) Il-Kapitolu B.47 ta' dan l-Anness, *Metodu ta' Ttestjar tal-Opaċità u l-Permeabilità tal-Kornea fil-Bovini għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Ħsara Serja lill-Għajnejn.*.

(17) B.48 Metodu ta' Ttestjar tal-Għajnejn tat-Tiġieġ Iżolati għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Ħsara Serja lill-Għajnejn.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

(20) KE (2008), ir-Regolament (KE) Nru Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. Il-ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.

(21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Tabella 1

L-iggradar tal-leżjonijiet okulari

Il-kornea	Grad
Opaċità: il-grad ta' densità (il-qari għandu jittieħed mill-iktar żona densa) (*)	
Ebda ulċerazzjoni jew opaċità	0
Partijiet mifruxin jew imxerrdin tal-opaċità (għajr skurar ħafif ta' tleqqija normali); dettalji tal-iris viżibbli biċ-ċar	1
Parti traslučida li tintlemaħ faċilment; dettalji tal-iris ftit oskurata	2
Parti nakruża; ebda dettalji tal-iris viżibbli; daqs tal-ħabba ftit li xejn jingħaraf	3
Kornea opaka; iris ma tistax tingħaraf mill-opaċità	4
Il-massimu possibbli: 4	
L-iris	
Normali	0
Tikmix fond ħafna, konġestjoni, nefħiet, iperemija ċirkumkorneali moderata; jew injezzjoni; iris reattiva għad-dawl (reazzjoni batuta titqies li hija effett	1
Emorraġija, qerda sinifikanti, jew ebda reazzjoni għad-dawl	2
Il-massimu possibbli: 2	
Il-konġuntivi	
Ħmura (tirreferi għal konġuntivi palpebrali u bulbari; eskluži l-kornea u l-iris)	
Normali	0
Xi vini iperemiċi (injettati)	1
Kulur diffuż, krimżi; vini individwali ma jingħarfux faċilment	2
Aħmar mitfi diffuż	3
Il-massimu possibbli: 3	
Il-kemoża	
Nefħiet (tirreferi għall-kpiepel u/jew il-membrani nittitanti)	
Normali	0
Xi nefħiet iktar min-normal	1
Nefħiet evidenti, b'everżjoni palpebrali parzjali	2
Nefħiet, bil-kpiepel kważi nofshom magħluqin	3
Nefħiet, bil-kpiepel iktar minn nofshom magħluqin	4
Il-massimu possibbli: 4	

(*) l-parti tal-opaċità tal-kornea trid tiġi osservata

▼**M7**

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Riserva tal-aċidi/alkali: Għal preparati aċidiċi, dan huwa l-ammont (g) ta' idrossidu tas-sodju/100 g tal-preparat meħtieġ għall-produzzjoni ta' pH speċifika. Għal preparati alkalini, dan huwa l-ammont (g) ta' idrossidu tas-sodju ekwivalenti għall-aċidu sulfuriku g/100 g tal-preparat meħtieġ għall-produzzjoni ta' pH speċifika (Young *et al.* 1988).

Sustanza Kimika: Sustanza jew taħlita.

Mhux irritanti: Is-sustanzi li mhumiex ikklassifikati bħala irritanti okulari tal-Kategorija I, II jew III tal-EPA; jew irritanti tal-għajnejn tal-GHS tal-Kategorija 1, 2, 2A, jew 2B; jew il-Kategorija 1 jew 2 tal-UE (17) (18) (19).

Korrużiva okulari: (a) Sustanza kimika li tikkawża ħsara irreversibbli fit-tessut għall-għajn; (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala irritanti tal-għajnejn tal-GHS tal-Kategorija 1, jew irritanti okulari tal-Kategorija I tal-EPA, jew il-Kategorija 1 tal-UE (17) (18) (19).

Irritanti okulari: (a) Sustanza kimika li tipproduċi bidla reversibbli fl-għajn; (b) Sustanzi kimiċi li huma kklassifikati bħala irritanti okulari tal-Kategorija II jew III tal-EPA; jew irritanti tal-għajnejn tal-GHS tal-Kategorija 2, 2A jew 2B; jew il-Kategorija 2 tal-UE (17) (18) (19).

Irranti okulari severa: (a) Sustanza kimika li tikkawża ħsara fit-tessut fl-għajn li ma tfiqx fi żmien 21 mill-applikazzjoni jew tikkaġuna tnaqqis fiżiku sever tal-vista; (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala irritanti tal-għajnejn tal-GHS tal-Kategorija 1, jew irritanti okulari tal-Kategorija I tal-EPA, jew il-Kategorija 1 tal-UE (17) (18)

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Approċċ sekwenzjali: Strateġija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi riveduta, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Piż tal-evidenza (proċess): Il-vantaġġi u l-iżvantaġġi ta' ġabra ta' informazzjoni jintużaw bħala l-bażi għal konklużjoni li jaf ma tkunx evidenti mid-dejta individwali.

▼M7

SUPPLIMENT GĦALL-METODU TA' TTESTJAR B.5 [1]

STRATEĠIJA TA' TTESTJAR SEKWENZALI GĦALL-IRRITAZZJONI U L-KORRUŻJONI TAL-GĦAJNEJN).

Kunsiderazzjonijiet ġenerali

Fl-interessi ta' xjenza valida u t-trattament xieraq tal-annimali, huwa importanti li jkun evitat l-użu bla bżonn tal-annimali, u li jitnaqqas l-ittestjar li aktarx li jipproduċi risponsi severi fl-annimali. L-informazzjoni kollha dwar sustanza kimika relatata mal-potenzal tagħha ta' irritazzjoni/korrużjoni okulari għandha tkun evalwata qabel ma jiġi kkunsidrat l-ittestjar *in vivo*. Jaf diġà jkun hemm biżżejjed evidenza sabiex sustanza kimika tat-test tkun tista' tiġi kklassifikata fir-rigward tal-potenzjal tagħha ta' irritazzjoni jew korrużjoni tal-għajnejn mingħajr il-ħtieġa li jsiru testijiet fuq annimali tal-laboratorju. Għalhekk, l-użu ta' analiżi tal-piż tal-evidenza u strateġija ta' ttestjar sekwenzjali sejjer inaqqas il-ħtieġa ta' testijiet *in vivo*, speċjalment jekk is-sustanza kimika aktarx li tipproduċi risponsi severi.

Huwa rakkommandat li tintuża analiżi tal-piż tal-evidenza għall-evalwazzjoni tal-informazzjoni eżistenti li tappartjeni għas-sustanzi ta' irritazzjoni u korrużjoni tal-għajnejn u sabiex jiġi stabbilit jekk għandhomx isiru studji addizzjonali, apparti minn studji *in vivo* fuq l-għajnejn, sabiex jgħinu fil-karatterizzazzjoni tat-tali potenzjal. Meta jkunu meħtieġa aktar studji, huwa rakkommandat li tintuża l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzali sabiex tiġi żviluppata d-dejta sperimentali rilevanti. Għal sustanzi li ma jkollhom l-ebda storja ta' ttestjar, għandha tintuża l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzali sabiex tiġi żviluppata d-dejta meħtieġa għall-evalwazzjoni tal-korrużjoni/irritazzjoni tagħhom għall-għajnejn. L-istrateġija ta' ttestjar inizjali deskritta f'dan is-Suppliment ġiet żviluppata f'sessjoni ta' ħidma tal-OECD (1). Imbagħad kompliet tiġi kkonfermata u elaborata fis-Sistema ta' Klassifikazzjoni Integrata Armonizzata għall-Effetti fuq is-Saħħa tal-Bniedem u l-Ambjent tas-Sustanzi Kimiċi, kif approvata mit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat dwar is-Sustanzi Kimiċi u l-Grupp ta' Ħidma dwar is-Sustanzi Kimiċi, f'Novembru 1998 (2), u aġġornata minn grupp ta' esperti tal-OECD fl-2011.

Għad li din l-istrateġija ta' ttestjar mhijiex parti integrata mill-metodu ta' ttestjar B.5, tesprimi l-approċċ rakkomandat għad-determinazzjoni tal-proprjetajiet ta' irritazzjoni/korrużjoni tal-għajnejn. Dan l-approċċ jirrappreżenta kemm l-aħjar prattika kif ukoll il-parametru referenzjarju etiku għall-ittestjar *in vivo* għall-irritazzjoni/korrużjoni tal-għajn. Il-metodu ta' ttestjar jipprovdi gwida għat-twettieq tat-test *in vivo* u jiġbor fih il-fatturi li għandhom ikunu indirizzati qabel ma jkun ikkunsidrat tali test. L-istrateġija ta' ttestjar sekwenzali tipprovdi approċċ tal-piż tal-evidenza għall-evalwazzjoni ta' dejta eżistenti dwar il-proprjetajiet ta' irritazzjoni/korrużjoni tal-għajnejn tas-sustanzi kimiċi u approċċ sekwenzjali għall-ġenerazzjoni tad-dejta rilevanti dwar sustanzi li dwarhom hemm bżonn li jsiru studji addizzjonali jew li dwarhom ma sar l-ebda studju. L-istrateġija l-ewwel tinkludi t-twettiq ta' testijiet in vitro jew *ex vivo* vvalidati u aċċettati u mbagħad ta' studji TM B.4 f'ċirkustanzi speċifiċi (3) (4).

Deskrizzjoni tal-istrateġija ta' ttestjar gradwali

Qabel ma jitwettqu t-testijiet bħala parti mill-istrateġija ta' ttestjar sekwenżjali (Figura), l-informazzjoni kollha disponibbli għandha tkun evalwata sabiex jiġi stabbilit hemmx bżonn li jsir ittestjar *in vivo* fuq l-għajnejn. Għalkemm tista' tinkiseb informazzjoni sinifikanti mill-evalwazzjoni ta' parametri singoli (eż. pH

[1] Għall-użu ta' strateġija ta' ttestjar integrat għall-irritazzjoni tal-għajnejn skont ir-REACH, ara wkoll l-ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Kapitolu R.7a: Endpoint specific guidance http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

estrema), għandha tiġi vvalutata l-informazzjoni kollha eżistenti. Id-dejta rilevanti kollha dwar l-effetti tas-sustanza kimika inkwistjoni, u tal-analogi strutturali tagħha, għandha tiġi evalutata fit-teħid tad-deċiżjoni tal-piż tal-evidenza, u għandu jiġi ppreżentat ir-raġunar wara d-deċiżjoni. L-enfasi ewlenija għandha tinxteħet fuq dejta eżistenti dwar il-bniedem u l-annimali rigward is-sustanza kimika, segwita mill-eżitu tal-ittestjar *in vitro* jew *ex vivo*. Studji *in vivo* ta' sustanzi kimiċi korrużivi għandhom ikunu evitati, kull meta dan ikun possibbli. Il-fatturi meqjusa għall-istrateġija tat-testijiet jinkludu:

Evalwazzjoni tad-dejta eżistenti dwar il-bniedem u/jew l-annimali u/jew dejta *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati (Stadju 1).

L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata dejta eżistenti dwar il-biedem, eż. studji kliniċi u okkupazzjonali, u rapporti ta' każijiet, u/jew dejta dwar testijiet fuq l-animali minn studji okulari u/jew dejta *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati għall-irritazzjoni/korrużjoni tal-għajnejn, għaliex din tipprovdi informazzjoni marbuta b'mod dirett mal-effetti fuq l-għajnejn. Wara, għandha tiġi evalwata d-dejta disponibbli minn studji fuq il-bniedem u/jew l-annimali li fihom tiġi investigata l-korrużjoni/irritazzjoni dermali, u/jew studji *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati għall-korrużjoni tal-ġilda. Sustanzi kimiċi b'korrużjoni jew irritazzjoni severa magħrufa, fuq l-għajnejn, m'għandhomx ikunu instillati fuq l-għajnejn tal-annimali, u l-anqas sustanzi kimiċi li juru effetti irritanti korrużivi jew severi fuq il-ġilda; dawn is-sustanzi kimiċi għandhom jitqiesu li huma korrużivi u/jew irritanti għall-għajnejn ukoll. Sustanzi kimiċi b'biżżejjed evidenza ta' nuqqas ta' korrużjoni u irritazzjoni minn studji okulari mwettqin fl-imgħoddi ma għandhomx jiġu ttestjati fi studji *in vivo* fuq l-għajnejn ukoll.

Analiżi tar-relazzjonijiet struttura-attività (SAR) (Stadju 2).

Ir-riżultati tat-testijiet fuq sustanzi kimiċi strutturalment relatati għandhom ikunu ikkunsidrati, jekk disponibbli. Meta jkun hemm biżżejjed dejta dwar il-bniedem u/jew l-annimali fuq sustanzi relatati strutturalment jew taħlitiet tat-tali sustanzi li tindika l-potenzjal ta' korrużjoni/irritazzjoni tagħhom għall-għajnejn, jista' jiġi supponut li s-sustanza kimika tat-test sejra tipproduċi l-istess risponsi. F'dawk il-każijiet, is-sustanza kimika jaf ma jkollhiex bżonn tiġi ttestjata. Dejta negattiva mill-istudji fuq sustanzi strutturalment relatati jew taħlitiet ta' tali sustanzi ma tkunx tikkostitwixxi evidenża suffiċjenti ta' nuqqas ta' korrużjoni/irritazzjoni ta' sustanza kimika permezz tal-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali. Għandhom jintużaw approċċi SAR vvalidati u aċċettati sabiex jiġi identifikat il-potenzjal ta' korrużjoni u irritazzjoni għal effetti dermali u dawk okulari.

Propjetajiet fiżikokimiċi u r-reattività kimika (Stadju 3).

Sustanzi kimiċi li jesibixxu pH estremi bħal ≤ 2.0 jew ≥ 11.5 jista' jkollhom effetti lokali qawwija. Jekk il-pH estrema hija l-bażi għall-identifikazzjoni ta' sustanza kimika bħala korrużiva jew irritanti għall-għajnejn, allura r-riserva aċida/alkalina tagħha (il-kapaċità mewwieta) tista' tkun ikkunsidrata wkoll (5)(6)(7). Jekk il-kapaċità mewwieta tissuġġerixxi li sustanza kimika jaf ma tkunx korrużiva għall-għajnejn (jiġifieri sustanzi kimiċi b'pH estrema u riserva aċida/alkalina baxxa), għandhom isiru iktar testijiet sabiex dan jiġi kkonfermat, idealment billi jintuża test *in vitro* jew *ex vivo* vvalidat u aċċettat (ara l-paragrafu 10).

Kunsiderazzjoni ta' informazzjoni eżistenti oħra (Stadju 4).

L-informazzjoni disponibbli kollha dwar it-tossiċità sistemika permezz tar-rotta dermali għandha tkun evalutata f'dan l-istadju. It-tossiċità dermali akuta tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun ikkunsidrata wkoll. Jekk ikun intwera li s-sustanza kimika tat-test hija ferm tossika bir-rotta dermali, jaf ma jkunx hemm

▼**M7**

bżonn li tkun ittestjata fl-għajnejn. Għalkemm mhux bilfors li jkun hemm relazzjoni bejn it-tossiċità akuta dermali u l-irritazzjoni/korrużjoni tal-għajnejn, jista' jkun supponut li jekk aġent ikun ferm tossiku permezz tar-rotta dermali, dan ikun jesibixxi wkoll tossiċità għolja meta jkun instillat fl-għajnejn. Tali dejta tista' tkun ikkunsidrata wkoll bejn l-Istadji 2 u 3.

Valutazzjoni tal-korrużjoni dermali tas-sustanza kimika jekk tkun meħtieġa għal finijiet regolatorji wkoll (Stadju 5).

Il-potenzjal ta' korrużjoni u irritazzjoni severa tal-ġilda għandu jiġi evalwat l-ewwel skont il-metodu ta' ttestjar B.4 (4) u s-Suppliment li jakkumpanjah (8), inkluż l-użu ta' metodi ta' ttestjar dwar il-korrużjoni tal-ġilda *in vitro* aċċettati internazzjonalment u vvalidati (9) (10) (11). Jekk jintwera li s-sustanza kimika tipproduċi korrużjoni jew irritazzjoni serja tal-ġilda, tista' tiġi kkunsidrata wkoll li hija korrużiva jew irritanti b'mod sever għall-għajnejn. B'hekk, ma jkun meħtieġ li jsir ebda test ulterjuri. Jekk is-sustanza kimika ma tkunx korrużiva jew severament irritanti għall-ġilda, għandu jsir test *in vitro* jew *ex vivo* fuq l-għajnejn.

Ir-riżultati mit-testijiet *in vitro* jew *ex vivo* (Stadju 6).

Is-sustanzi kimiċi li jkunu wrew proprjetajiet korrużivi jew irritanti severi f'test *in vitro* jew *ex vivo* (12) (13) li jkun ġie vvalidat u aċċettat internazzjonalment għall-valutazzjoni speċifika tal-korrużjoni/irritazzjoni tal-għajnejn, ma għandhomx bżonn jiġu ttestjati fl-annimali. Jista' jkun supponut li tali sustanzi kimiċi jipproduċu l-istess effetti severi *in vivo*. Jekk ma jkunx hemm testijiet *in vitro/ex vivo* vvalidati u aċċettati disponibbli, wieħed għandu jaqbeż l-Istadju 6 u jmur direttament għall-Istadju 7.

Test *in vivo* fuq il-fniek (Stadji 7 u 8):

L-ittestjar okulari *in vivo* għandu jibda b'test inizjali li juża annimal wieħed. Jekk ir-riżultati ta' dan it-test jindikaw li s-sustanza kimika tkun severament irritanti jew korrużiva għall-għajnejn, ma għandux isir iktar ittestjar. Jekk dak it-test ma jiżvelax effetti korrużivi jew irritanti severi, isir test konfermatorju b'żewġ annimali oħrajn. Skont ir-riżultati tat-test konfermatorju, jaf ikun hemm bżonn ta' iktar testijiet. [ara l-metodu ta' ttestjar B.5]

▼M7

STRATEĠIJA GĦALL-ITTESTJAR U L-EVELWAZZJONI TA' IRRITAZZJONI/KORRUŻJONI TAL-GĦAJNEJN

	Attività	Sejba	Konklużjoni
1	Dejta eżistenti dwar il-bniedem u/jew l-annimali, u/jew dejta *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati li juru l-effetti fuq l-għajnejn	Ħsara severa għall-għajnejn	Punt finali apikali; ikkunsidra korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
		Irritazzjoni għall-għajnejn	Punt finali apikali; ikkunsidra irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
		Ma hemmx korrużjoni/ma hemmx irritazzjoni għall-għajnejn	Punt finali apikali; ikkunsidra li ma hemmx korrużjoni u ma hemmx irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	Dejta eżistenti dwar il-bniedem u/jew l-annimali, u/jew dejta *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati li juru l-effetti korrużivi fuq il-ġilda	Korrużjoni għall-ġilda	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	Dejta eżistenti dwar il-bniedem u/jew l-annimali, u/jew dejta *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati li juru l-effetti irritanti severi fuq il-ġilda	Irritazzjoni severa għall-ġilda	Assumi irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test
	↓		
	ebda informazzjoni disponibbli, jew l-informazzjoni disponibbli mhijiex konklużiva		
	↓		
2	Aġħmel SAR għall-korrużjoni/irritazzjoni tal-għajnejn	Hija mbassra ħsara severa għall-għajnejn	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
		Hija mbassra irritazzjoni għall-għajnejn	Assumi irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	Ikkunsidra SAR għall-korrużjoni tal-ġilda	Hija mbassra korrużjoni għall-ġilda	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	↓		
	Ma tista' ssir ebda previżjoni, jew il-previżjonijiet mhumiex konklużivi jew huma negattivi		
	↓		
3	Kejjel il-pH (kapaċità mewwieta, jekk rilevanti)	pH ≤ jew ≥ 11,5 (b'kapaċità mewwieta għolja, jekk rilevanti)	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	↓		
	2 < H < 11,5, jew pH ≤ 2,0 jew ≥11,5 b'kapaċità mewwieta baxxa/b'ebda kapaċità mewwieta, jekk rilevanti		
	↓		
4	Ikkunsidra d-dejta eżistenti dwar it-tossiċità sistemika permezz tar-rotta dermali	Tossiċità għolja f'konċentrazzjonijiet li jkunu ttestjati fuq l-għajn.	Is-sustanza kimika tkun tossika wisq sabiex tiġi ttestjata. Ma hemm bżonn tal-ebda test.

▼M7

	Attività	Sejba	Konklużjoni
	↓		
	Tali informazzjoni mhijiex disponibbli, jew is-sustanza kimika mhijiex tossika ħafna		
	↓		
5	Ivvaluta l-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda b'esperimenti skont l-istrateġija ta' ttestjar fil-kapitolu B.4 ta' dan l-Anness jekk ikun hemm bżonn li jsir hekk għal finijiet regolatorji wkoll	Rispons korruživ jew irritanti severament	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.
	↓		
	Is-sustanza kimika mhijiex korruživa jew severament irritanti għall-ġilda		
	↓		
6	Agħmel test(ijiet) okulari *in vitro* jew *ex vivo* vvalidat(i) u aċċettat(i)	Rispons korruživ jew irritanti severament	Assumi korrużjoni jew irritazzjoni severa għall-għajnejn, diment li t-test imwettaq jista' jintuża sabiex jidentifika korruživi/irritanti severi u s-sustanza kimika tkun fi ħdan id-dominju tal-applikabilità tat-test. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.
		Rispons irritanti	Assumi irritazzjoni għall-għajnejn, diment li t-test(ijiet) imwettaq jista' jintuża sabiex jidentifika kif suppost korruživi/irritanti severi u irritanti, u s-sustanza kimika hija fi ħdan id-dominju tal-applikabilità tat-test(ijiet). Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.
		Rispons mhux irritanti	Assumi li ma hemmx irritazzjoni għall-għajnejn, diment li t-test(ijiet) imwettaq jista' jintuża sabiex jidentifika kif suppost mhux irritanti, jagħmel distinzjoni kif suppost ta' dawn minn sustanzi kimiċi li huma irritanti, irritanti severi, jew korruživi okulari, u s-sustanza kimika hija fi ħdan id-dominju tal-applikabilità tat-test. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.
	↓		
	Test(ijiet) in vitro jew ex vivo vvalidat(i) u aċċettat(i) ma jistgħux jintużaw sabiex tintlaħaq konklużjoni		
	↓		

▼M7

	Attività	Sejba	Konklużjoni
7	Agħmel test inizjali tal-għajnejn *in vivo* fuq il-fniek billi tuża annimal wieħed	Ħsara severa għall-għajnejn	Ikkunsidra korrużjoni lill-għajnejn. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.
	↓		
	L-ebda ħsara severa, jew l-ebda rispons		
	↓		
8	Agħmel test konfermatorju billi tuża annimal addizzjonali wieħed jew tnejn	Korrużjoni jew irritazzjoni	Ikkunsidra korrużjoni jew irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.
		Ma hemmx korrużjoni jew irritazzjoni	Ikkunsidra li ma hemmx irritazzjoni u ma hemmx korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.

TAGĦRIF

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Li sar f'Solna, l-Iżvezja, 22 — 24 ta' Jannar 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/Korrużjoni Dermali Akuta.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 — 26.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, pp.483 — 524.

(7) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 — 231.

(8) Suppliment għall-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Strateġija ta' Ttestjar Sekwenzjali għall-Irritazzjoni u l-Korrużjoni tal-Ġilda.

(9) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Test tar-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER).

(10) Kapitolu B.40bis of this Annex, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Test Mudell tal-Ġilda tal-Bniedem.

(11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼**M7**

(12) Il-Kapitolu B.47 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Opaċità u l-Permeabilità tal-Kornea fil-Bovini għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Ħsara Serja lill-Għajnejn.

(13) Kapitolu B.48 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Għajnejn tat-Tiġieġ Iżolati għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Ħsara Serja lill-Għajnejn.

▼B

B.6. **SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Rimarki:

Is-sensittività u l-abbiltà tat-testijiet li jintebħu b'sensitizzaturu potenzali għall-ġilda umana huma meqjusa bħala importanti fis-sistema tal-klassifikazzjoni dwar it-tossiċità relevanti għas-saħħa pubblika.

M'hemm l-ebda metodu wieħed ta' test li b'mod adegwat jidentifika s-sustanzi kollha bil-potenzjal għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda umana u li huwa relevanti għas-sustanzi kollha.

Fatturi bħalma huma l-karatteristċi fiżiċi ta' sustanza, inkluża l-abbiltà tagħha li tippenetra l-ġilda, għandhom ikunu meqjusa fil-għażla tat-test.

Żewġ tipi ta' testijiet bl-użu tal-fniek ta' l-indi ġew żviluppati: testijiet tat-tip adġuvanti, li fihom l-istat ellerġiku jkun ippotenzjat bit-taħlil jew bis-sospensjoni tas-sustanza tat-test fi Freunds Complete Adjuvant (FCA), u f'testijiet mhux adġuvanti.

Testijiet tat-tip adġuvanti pjuttost li jkunu aktar eżatti fit-tbassir ta' effett sensitizzanti probabbli tal-ġilda ta' sustanza fuq il-bniedem milli dawk il-metodi li ma jutilizzawx il-Freunds Complete Adjuvant u huma għalhekk il-metodi preferiti.

It-test tal-Massimizzazzjoni tal-Fenek ta' l-Indi (GPMT) huwa test tat-tip adġuvanti ferm użat. Għalkemm diversi metodi oħrajn jistgħu jkunu użati għas-sejbien tal-potenzjal ta' sustanza li tikkaġuna reazzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, il-GPMT huwa meqjusa bħala li huma t-teknika adġuvinanti preferuta.

B'ħafna mill-klassijiet kimiċi, testijiet mhux-adġuvinanti (dak preferut huwa t-test Buehler) huma meqjusa bħala li huma anqas sensittivi.

F'ċerti każi jista' jkun hemm raġunijiet tajbin għall-għażla tat-test Buehler li jinvolvi applikazzjoni topika pjuttost milli l-injezzjoni intradermali użata fit-Test tal-Massimizzazzjoni tal-Fenek ta' l-Indi. Ġustifikazzjoni xjentifika għandha tkun mogħtija meta t-test Buehler ikun użat.

It-Test tal-Massimizzazzjoni tal-fenek ta' l-Indi (GPMT) u t-test Buehler huma deskritti f'dan il-metodu. Metodi oħrajn jistgħu ikunu użati basta li dawn ikunu validati tajjeb u l-ġustifikazzjoni xjentifika tkun mogħtija.

Jekk ikun jidher riżultat pożittiv f'test ta' screening rikonoxxut, sustanza tat-test jista' jiġi ddisinjat bħala sensitizzatur potenzjali, u jista' ma jkunx meħtieġ test ieħor fuq il-fniek ta' l-Indi. Madankollu, jekk ikun hemm riżultat negattiv f'test bħal dan, it-test fuq il-fniek ta' l-Indi jrid isir bil-proċedura deskritta f'dan il-metodu tat-test.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: (kuntatt allerġiku *dermatitis*) hija reazzjoni immunoloġikament *cutaneous* għas-sustanza. Fil-bniedem, ir-rispons jista' jkun karatterizzat minn *pruritis, erythema, oedema, papules, vesicles, bullae* jew kombinazzjoni ta' dawn. Fi speċje oħra ir-reazzjonijiet jistgħu ivarjaw u l-*erythemau* l- *oedema* biss jistgħu jidhru.

Espożizzjoni ta' induzzjoni: espożizzjoni sperimentali ta' suġġett għal sustanza tat-test bil-ħsieb li joħloq stat ipersensittiv.

Il-perjodu ta' induzzjoni: perjodu ta' mill-inqas ġimgħa wara l-espożizzjoni ta' induzzjoni li matulu jista' jiżviluppa stat ipersensittiv.

Espożizzjoni ta' tħaqqieq: espożizzjoni sperimentali ta' suġġett li jkun ġie trattat qabel għas-sustanza tat-test wara l-perjodu ta' induzzjoni, sabiex jiġi determinat jekk is-suġġett jirreaġixxix b'mod ipersensittiv.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sensittività u l-kredibilità tat-teknika sperimentali għandha tiġi valutata kull sitt xhur bl-użu tas-sustanzi, li huma magħrufa li jkollhom proprjetajiet ta' sensitizzazzjoni għall-ġilda ħfief għal moderati.

F'test magħmul sew, huwa mistenni li għal sesitizzaturi ħfief għal moderati jkun hemm rispons ta' mill-inqas 30 % f'test adġuvinanti u mill-inqas 15 % f'test li mhux adġuvinanti.

Is-sustanzi li ġejjin huma preferuti.

Numri CAS	Numri EINECS	Ismijiet EINECS	Ismijiet komuni
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldehyde	α-hexylcinnamaldehyde
149-30-4	205-736-8	Benzothiazole-2-thiol (mercaptobenzothiazole)	kaptax
94-09-7	202-303-5	Benzocaine	norcaine

Jista' jkun hemm ċirkustanzi fejn, b'ġustifikazzjoni adegwata mogħtija jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll oħra li jissodisfaw il-kriterji t'hawn fuq.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

L-annimali għat-test huma esposti fil-bidu għas-sustanza tat-test permezz ta' injezzjonijiet intradermali u/jew applikazzjoni epidermali espożizzjoni ta' induzzjoni). Wara perjodu ta' waqfa ta' minn 10 sa 14-il jum (perjodu ta' induzzjoni), li matulu jista' jiżviluppa rispons ta' immunità, l-annimali jiġu esposti għal doża ta' tħaqqieq. Il-grad u l-firxa tar-reazzjoni tal-ġilda għall-espożizzjoni ta' tħaqqieq fl-annimali għat-test huma mqabbla ma' dak li ntwera fl-annimali ta' kontroll li jġarrbu l-istess trattament waqt l-induzzjoni u jirċievu l-espożizzjoni ta' tħaqqieq.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODI TAT-TEST

Jekk it-tneħħija tas-sustanza tat-test hija meħtieġa, dan għandu jinkiseb bl-użu ta' l-ilma jew solvent xieraq mingħajr bidla fir-rispons li jkun hemm jew fl-integrità ta' l-epidermi.

▼B

1.5.1. *Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek ta' l-Indi (TMFI)*

1.5.1.1. P r e p a r a z z j o n i j i e t

Fniek ta' l-indi albino, żgħażagħ u b'saħħithom jadattaw għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju mill-inqas 5 ijiem qabel it-test. Qabel it-test, l-annimali jingħażlu bl-addoċċ fi gruppi ta' trattament. It-tneħħija tax-xagħar isir permezz ta' l-ikklippjar, tqaxxir jew possibilment depolazzjoni kemikali, skond il-metodu tat-test użat. Għandha tingħata attenzjoni sabiex il-ġilda ma tiġix migrufa. L-annimali jintiżnu qabel jibda t-test u fi tmiemu.

1.5.1.2. K u n d i z z j o n i j i e t t a t - t e s t

1.5.1.2.1. Annimali għat-test

Razzez tal-fniek ta' l-indi albino normalment użati fil-laboratorju huma utilizzati

1.5.1.2.2. In-numru u s-sess

Annimali maskili u/jew femminili jistgħu ikunu użati. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma welldu u li mhumiex tqal.

Minimu ta' 10 annimali huma użati fil-grupp ittrattat u mill-anqas 5 fil-grupp tal-kontroll. Meta inqas minn 20 test u 10 fniek ta' l-Indi jkunu ntużaw, u mhux possibbli tikkonkludi li s-sustanza għat-test hija sensitizzatur, huwa rakkomandat ħafna li jiġu ttestjati iktar annimali sabiex ikun hemm mill-inqas total ta' 20 test u 10 annimali tal-kontroll.

1.5.1.2.3. Livelli tad-doża

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija aġġustata lejn livell li jipproduċi xi ftit ta' l-evidenza ta' l-irritazzjoni tal-ġilda, imma li tkun tollerata tajjeb mill-annimali matul kull stadju ta' l-induzzjoni. Il-konċentrazzjoni użata għandha tkun il-massimu li ma jipproduċi l-ebda evidenza ta' l-irritazzjoni tal-ġilda f'annimali li mhumiex sensitizzati. Dawn il-konċentrazzjoninijiet jistgħu jkunu determinati fi skala żgħira b'żewġ jew tliet annimali waqt l-istudju pilota ladarba informazzjoni oħra ma tkunx disponibbli. L-annimali trattati bl-FCA għandhom jiġu kkunsidrati għal dan il-għan.

1.5.1.3. I l - P r o ċ e d u r a

1.5.1.3.1. L-induzzjoni

Jum 0 – il-grupp ittrattat

Il-pari segwenti ta' injezzjonijiet intradermali, kull waħda ta' 0,1 ml, huma mogħtija fiż-żona ta' l-ispalla li ma jkollhiex suf ħekk li kull wieħed mill-pari jkun fuq kull naħa taċ-ċentru ta' l-annimal.

Injezzjoni 1: it-taħlita ta' (v/v) FCA/l-ilma jew salin fiżjoloġiku 1:1

Injezzjoni 2: is-sustanza tat-test, bil-mezz xieraq u bil-konċentrazzjoni magħżula

Injezzjoni 3:is-sustanza tat-test bil-konċentrazzjoni magħżula fformulata f'taħlita 1:1 (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjoloġiku

▼B

Fl-injezzjoni 3, is-sustanzi li jinħallu fl-ilma huma mdewba fil-fażi akweja qabel it-taħlit ma' l-FCA. Is-sustanzi liposolubbli jew insolubbli huma mdendla fl-FCA qabel il-kombinazzjoni mal-fażi akweja. Il-konċentrazzjoni finali tas-sustanza għat-test għandha tkun ugwali għal dik użata fit-2 injezzjoni.

L-injezzjonijiet 1 u 2 jingħataw waħda wara l-oħra u qrib ir-ras kemm jista' jkun, waqt illi l-injezzjoni 3 tkun lejn il-parti kawdjali taż-żona tat-test.

Jum 0 – il-grupp tal-kontroll

It-tliet pari ta' injezzjonijiet intradermali ta' 0,1 ml f'volum il-waħda jingħataw fl-istess żoni bħal fl-annimali trattati.

Injezzjoni 1: it-taħlita (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjoliġiku 1:1

Injezzjoni 2: il-mezz mhux maħlul fl-ilma

Injezzjoni 3: formulazzjoni ta' 50 % w/v tal-mezz f'taħlita (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjoloġiku 1:1

5-7 jum – gruppi ta' kontroll trattati

Bejn wieħed u ieħor erbgħa u għoxrin siegħa qabel l-applikazzjoni ta' l-induzzjoni topikali, jekk is-sustanza mhix irritanti għall-ġilda, iż-żona tat-test, wara l-ikklippjar u/jew it-tqaxxir tiġi trattata b'0,5 ml ta' 10 % mis- sulfat lawrju tas-sodju fil-vażelina, sabiex tinħoloq irritazzjoni lokali.

Jum 6-8 tal-grupp trattat

Iż-żona tat-test terġa' titnaddaf mis-suf. *Filter paper* (2 x 4 ċm) titgħabba kollha bis-sustanza għat-test f'mezz xieraq u applikata fuq iż-żona tat-test u miżmuma f'kuntatt permezz ta' faxxa okklussiva għal 48 siegħa. L-għażla tal-mezz għandha tkun ġustifikata. Is-solidi jiġu pulverizzati b'mod fin u inkorporati f'mezz xieraq. Il-likwidi jistgħu jiġu applikati mingħajr taħlit bl-ilma jekk inhu xieraq.

Jum 6-8 grupp ta' kontroll

Iż-żona tat-test terġa' titnaddaf mis-suf. Il-mezz biss huwa applikat b'mod simili liż-żona tat-test u miżmum f'kuntatt permezz ta' faxxa okklussiva għal 48 siegħa.

1.5.1.3.2. It-tħaqqieq

Jum 20-22 gruppi ta' kontroll trattati

Il-ġenbejn huma trattati u l-annimali tal-kontroll huma mnaddfa mix-xagħar. Biċċa jew kapsula li jkun fiha s-sustanza tat-test hija applikata ma' wieħed mill-ġnub ta' l-annimali ittratati u l-biċċa jew il-kapsula mil-mezz biss mal-ġemb l-ieħor. Il-biċċiet huma miżmuma b'faxxa okklussiva għal 24 siegħa.

L-osservazzjoni u l-iggradar: gruppi ta' kontroll trattati

— Bejn wieħed u ieħor 21 siegħa wara t-tneħħija tal-biċċa, iż-żona mħaqqa hija mnaddfa u kklippjata u/jew imqaxxra u depilata jekk ikun meħtieġ,

— Bejn wieħed u ieħor 3 sigħat wara (bejn wieħed u ieħor 48 siegħa mill-bidu ta' l-applikazzjoni tat-tħaqqieq) ir-reazzjoni tal-ġilda hija osservata u rrekordjata skond il-gradi li jidhru fl-appendiċi;

— Bejn wieħed u ieħor 24 siegħa wara din l-osservazzjoni, it-tieni osservazzjoni (72 siegħa) hija mwettqa u rrekordjata għal darb'oħra.

Il-qari bl-addoċċ ta' l-annimali ta' kontroll u tat-test huwa nkuraġġit.

Sabiex ikunu kjarifikati r-riżultati miksuba fl-ewwel tħaqqieqa, t-tieni tħaqqieqa, fejn hu xieraq mal-grupp tal-kontroll ġdid, għandha tkun meqjusa madwar ġimgha minn wara l-ewwel waħda. Tħaqqieq għat-tieni darba jista' jsir ukoll fuq il-grupp ta' kontroll oriġinali.

▼B

Ir-reazzjoni kollha tal-ġilda f'xi sejbiet mhux tas-soltu inklużi r-reazzjonijiet sistematiċi li jirriżultaw mill-proċeduri ta' l-induzzjoni u tat-tħaqqieq għandhom ikunu osservati u rrekordjati skond l-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman (Ara l-appendiċi). Proċeduri oħra, eż. L-eżaminazzjoni ħispatoloġika, il-kejl tal-ħxuna tat-tinja tal-ġilda, tista' titwettaq sabiex jiġu ċċarati ir-reazzjonijiet dubbjużi.

1.5.2. *It-test Buehler*

1.5.2.1. P r e p a r a z z j o n i j i e t

Fniek ta' l-indi albino, żgħażagħ u b'saħħithom jadattaw għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju 5 ijiem qabel it-test. Qabel it-test, l-annimali jinġabru kif jinzerta u assenjati għall-gruppi ta' trattament. Il-pil jitneħħa billi jiġi kklippjat, imqaxxar jew possibilment depilat kimikament skond il-metodu tat-test użat. Għandha tingħata attenzjoni sabiex tkun evitata li ssir xi ħsara lill-ġilda. L-annimali jintiżnu qabel ma jibda t-test u fi tmiemu.

1.5.2.2. I l - k u n d i z z j o n i j i e t t a t - t e s t

1.5.2.2.1. L-annimali għat-test

Razez tal-fniek ta' l-indi albino normalment użati fil-laboratorju huma utlizzati.

1.5.2.2.2. Numru u sess.

Annimali maskili u/jew femminili jistgħu jintużaw. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma welldu u li mhumiex tqal.

Minimu ta' 20 annimal huma użati fil-grupp ittrattat u mill-anqas 10 fil-grupp tal-kontroll.

1.5.2.2.3. Il-livelli tad-doża

Għal kull stadju ta' l-induzzjoni, il-konċentrazzjonini tas-sustanza tat-test hija aġġustata għal-ogħla livell possibbli biex tipproduċi irritazzjoni ħafifa imma mhux eċċessiva. Il-konċentrazzjoni mħaqqa għandha tkun il-massimu tad-doża mhux irritanti. Jekk ikun meħtieġ il-konċentrazzjonini xierqa tista' tiġi determinata minn studju pilota bl-użu ta' żewġ jew tliet annimali.

Għall-materjali tat-test li jinħallu fl-ilma, huwa xieraq li jintuża l-ilma jew soluzzjoni mħallta bl-ilma li ma tikkawżax irritazzjoni ta' *surfactant* bħala l-mezz. Għal materjali tat-test oħra 80 % ta' l-etanol/l-ilma huwa preferut għall-induzzjoni u t-tħaqqieq ta' l-*acetone.*

1.5.2.3. I l - p r o ċ e d u r a

1.5.2.3.1. L-induzzjoni

Jum 0 – il-grupp trattat

Ġenb wieħed huwa mnaddaf mill-pil (ikklippjat). Is-sistema tal-biċċa għat-test għandha titgħabba tajjeb bis-sustanza għat-test f'mezz xieraq (l-għażla tal-mezz għandha tkun ġustifikata; is-sustanzi għat-test likwidi jistgħu jiġu applikati mingħajr ma jitħalltu bl-ilma, jekk ikun xieraq).

Is-sistema tal-biċċa għat-test hija applikata fuq iż-żona tat-test u miżmuma f'kuntatt permezz ta' biċċa okklussiva jew kapsula u faxxa xierqa għal 6 sigħat.

▼B

Is-sistema tal-biċċa għat-test trid tkun okklussiva. Biċċa tal-qoton hija adattata u tista' tkun tonda jew kwadra, iżda għandha tkun bejn wieħed u ieħor minn 4-6 cm^2. Iż-żamma permezz ta' żamma xierqa hija preferuta sabiex tiżgura l-okklużjoni. Jekk jiġi użat it-tqarwis, espożizzjonijiet addizzjonali jistgħu jkunu meħtieġa.

Jum 0 – il-grupp tal-kontroll

Ġenb wieħed huwa mnaddaf mill-pil (bl-ikklippjar). Il-mezz biss huwa applikat b'manjera simili bħal dik għall-grupp trattat. Is-sistema tal-biċċa għat-test tinżamm f'kuntatt mal-ġilda b'biċċa jew kapsula oklussiva u faxxa xierqa għal 6 sigħat. Jekk jista' jintwera li grupp ta' kontroll falz mhux meħtieġ, jista' jintuża grupp ta' kontroll naive.

Jiem 6-8 u 13-15 – il-grupp ta' kontroll trattat

Titwettaq l-istess applikazzjoni bħal fil-jum 0 fuq l-istess żona għat-test (nadifa mill-pil jekk ikun meħtieġ) tal-ġenb fil-jum 6-8, u għal darb'oħra fil-jum 13-15.

1.5.2.3.2. It-tħaqqieq

Il-jum 27-29 – il-grupp ta' kontroll trattat

Il-ġenb li ma ġiex trattat ta' l-annimali ta' kontroll u trattati jitnaddaf mill-pil (bl-ikklippjar). Biċċa okklussiva jew kabina li jkun fiha l-ammont xieraq tas-sustanza għat-test tiġi applikata fil-massimu tal-konċentrazzjoni li mhix irritanti fuq il-ġenb mhux trattat ta' wara ta' l-annimali ta' kontroll u trattati.

Fejn jgħodd, biċċa okklussiva jew kabina bil-mezz biss tiġi applikata fuq il-ġenb mhux trattat ta' quddiem ta' l-annimali li huma kemm kontrollati u kemm trattati. Il-biċċiet jew kabini huma miżmuma f'kuntatt permezz ta' faxex xierqa għal 6 sigħat.

1.5.2.3.3. L-osservazzjoni u l-iggradar

— Bejn wieħed u ieħor 21 siegħa wara t-tneħħija tal-biċċa, ż-żona mħaqqa hija mnaddfa mill-pil;

— Bejn wieħed u ieħor tliet sigħat aktar tard (bejn wieħed u ieħor 30 siegħa mill-bidu ta' l-applikazzjoni tal-biċċa tat-tħaqqieq) ir-reazzjoni tal-ġilda hija osservata u rrekordjata skond il-gradi murija fl-appendiċi;

— Bejn wieħed u ieħor 24 siegħa wara l-osservazzjoni ta' 30 siegħa, (bejn wieħed u ieħor 54 siegħa wara l-applikazzjoni tal-biċċa tat-tħaqqieq) ir-reazzjonijiet tal-ġilda huma għal darb'oħra osservati u rrekordjati.

Il-qari bl-addoċċ ta' l-annimali ta' kontroll u għat-test huwa nkuraġġit.

Sabiex ikunu kjarifikati r-riżultati miksuba fl-ewwel tħaqqieqa, t-tieni tħaqqieqa, fejn hu xieraq mal-grupp tal-kontroll ġdid, għandha tkun meqjusa madwar ġimgha minn wara l-ewwel waħda. Tħaqqieq għat-tieni darba jista' jsir ukoll fuq il-grupp ta' kontroll oriġinali.

▼B

Ir-reazzjoni kollha tal-ġilda f'xi sejbiet mhux tas-soltu inklużi r-reazzjonijiet sistematiċi li jirriżultaw mill-proċeduri ta' l-induzzjoni u tat-tħaqqieq għandhom ikunu osservati u rrekordjati skond l-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman (Ara l-appendiċi). Proċeduri oħra, eż. L-eżaminazzjoni ħispatoloġika, il-kejl tal-ħxuna tat-tinja tal-ġilda, tista' titwettaq sabiex jiġu ċċarati ir-reazzjonijiet dubbjużi

2. **DATA (GPMT u t-test buehler)**

Id-data għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull annimal individwali r-reazzjonijiet tal-ġilda għal kull perjodu ta' l-osservazzjoni.

3. **RAPPURTAĠĠ (GPMT u t-test Buehler)**

Jekk l-i*screening* isir qabel it-test fuq il-fenek ta' l-Indi, id-deskrizzjoni jew ir-referenza tat-test (eż. It-Test ta' l-Infiħ tal-Widnejn tal-Ġurdien (TIWĠ), inklużi d-dettalji tal-proċedura, iridu jingħataw flimkien mar-riżultati miksuba mas-sustanzi tat-test u tar-referenza.

Rapport tat-test (GPMT u t-test Buehler)

Ir-rapport tat-test għandu, jekk inhu possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Annimali għat-test:

— ir-razza tal-fniek ta' l-indi użata;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— is-sors. Il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew. Id-dieta eċċ.;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test u fi tmiemu.

Il-kundizzjonijiet tat-test

— it-teknika tal-preparazzjoni taż-żona tal-biċċa;

— id-dettalji tal-materjali tal-biċċa użati u t-teknika tal-biċċa;

— ir-riżultat ta' l-istudju pilota bil-konklużjoni fuq l-induzzjoni u l-konċentrazzjonijiet tat-tħaqqieq li jridu jintużaw fit-test;

— id-dettalji tal-preparazzjoni tas-sustanza għat-test, l-applikazzjoni u t-tneħħija;

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;

— il-mezz u l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza għat-test użati għall-induzzjoni u l-espożizzjonijiet tat-tħaqqieq u l-ammont totali tas-sustanza applikata għall-induzzjoni u għattħaqqieq.

Ir-riżultati:

— taqsira tar-riżultati ta' l-aħħar ċekkjatura għas-sensittività u għall-kredibilità (ara 1.3) inkluża l-informazzjoni fuq is-sustanza, il-konċentrazzjoni u l-mezz użat;

▼B

— ta’ kull annimal inkluża s-sistema ta’ gradazzjoni;

— deskrizzjoni narrativa ta’ l-effetti tan-natura u tal-gradi osservati;

— kwalunkwe sejbiet hispatoloġiċi.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

Dan il-metodu huwa analogu għal OECD TG 406

▼B

Appendiċi

TABELLA

L-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman għall-evalwazzjoni tat-test għar-reazzjonijiet tal-biċċa tat-tħaqqieq

0 = l-ebda bidla ċara

1 = *erythema* moderata jew fi dbabar

2 = *erythema* moderata u konfluwenti

3 = *erythema* intensa u nefħa

▼M4

B.7. STUDJU DWAR IT-TOSSIĊITÀ ORALI TA' DOŻA RIPETUTA KULL 28 JUM FIR-RODITURI

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test 407 (2008) tal-OECD. Il-Linja Gwida tat-Test 407 oriġinali kienet adottata fl-1981. Fl-1995 kienet adottata verżjoni riveduta, biex tinkiseb informazzjoni addizzjonali mill-annimal użat fl-istudju, b'mod partikolari dwar in-newrotossiċità u l-immunotossiċità.

2. Fl-1998, l-OECD bdiet attività ta' prijorità kbira, biex tirrevedi l-Linji Gwida tat-Testijiet eżistenti u biex tiżviluppa Linji Gwida tat-Testijiet ġodda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (8). Element wieħed tal-attività kien li tkun aġġornata l-linja gwida eżistenti tal-OECD għal "studju dwar it-tossiċità orali ta' doża ripetuta kull 28 jum fir-rodituri" (TG 407) b'parametri adatti biex tkun individwata attività endokrinali ta' kimiċi għall-ittestjar. Din il-proċedura għaddiet minn programmm internazzjonali estensiv biex tittestjata għar-rilevanza u l-prattikabbiltà tal-parametri addizzjonali, il-prestazzjoni ta' dawn il-parametri għal kimiċi b'attività (anti)estroġenika, (anti)androġenika u (anti)tirojde, l-intra- u l-inter-riproduċibbiltà tal-laboratorju u l-interferenza tal-parametri l-ġodda ma' dawk meħtieġa mit-TG 407 ta' qabel. L-ammont kbir ta' dejta li nkisbet b'hekk kienet ikkompilata u evalwata fid-dettall f'rapport komprensiv tal-OECD (9). Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 aġġornat (bħala ekwivalenti għat-TG 407) huwa r-riżultat tal-esperjenza u r-riżultati miksubin matul il-programmm tat-test internazzjonali. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jippermetti li ċerti effetti medjati mis-sistema endokrinali jitqiegħdu f'kuntest ma' effetti tossikoloġiċi oħra.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kimika, id-determinazzjoni ta' tossiċità orali bl-uzu ta' dożi ripetuti tista' ssir wara li tkun inkisbet l-informazzjoni inizjali dwar it-tossiċità bl-ittestjar ta' tossiċità akuta. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa maħsub biex ikunu investigati l-effetti fuq varjetà wiesgħa ħafna ta' miri potenzjali ta' tossiċità. Jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalgħu minn espożizzjoni ripetuta tul perjodu ta' żmien relattivament qasir, inklużi effetti fuq is-sistema nervuża, immunitarja u endokrinali. Dwar dawn il-punti ta' tmiem partikolari, għandu jidentifika kimiċi b'potenzjal newrotossiku, li jistgħu jagħtu lok għal investigazzjoni ulterjuri fil-fond ta' dan l-aspett, u kimiċi li joħolqu interferenza fil-fiżjoloġija tat-tirojde. Jista' jipprovdi wkoll dejta dwar kimiċi li jaffettwaw l-organi riproduttivi tar-raġel u/jew tal-mara f'annimali adulti żgħażagħ u jista' jagħti indikazzjoni tal-effetti immunoloġiċi.

4. Ir-riżultati minn dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 għandhom jintużaw għall-identifikazzjoni ta' perikli u l-valutazzjoni tar-riskju. Ir-riżultati miksubin mill-parametri relatati mal-endokrinali għandhom jitqiesu fil-kuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi li Jqallbu l-Endokrinali" (11). Il-metodu jinkuldi l-istudju dwar id-doża bażika ripetuta ta' tossiċità li jista' jintuża għal kimiċi li dwarhom ma jkunx jista' jsir studju ta' 90 jum (eż. meta l-volum tal-produzzjoni ma jkunx jeċċedi ċerti limiti) jew bħala preliminari għal studju fit-tul. Id-durata tal-espożizzjoni għandha tkun ta' 28 jum.

▼M4

5. Il-programm internazzjonali imwettaq skont il-validazzjoni ta' parametri adatti biex potenzjalment tinstab attività endokrinali ta' kimika għall-ittestjar wera li l-kwalità tad-dejta miksuba b'dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 tkun tiddependi ħafna mill-esperjenza mil-laboratorju tat-test. Dan jirrelata speċifikatament għad-determinazzjoni istopatoloġika ta' bidliet ċikliċi fl-organi riproduttivi tal-mara u għad-determinazzjoni tal-piż tal-organi żgħar dipendenti mill-ormoni li jkunu diffiċli jiġu ddissektjati. Ġiet żviluppata gwida dwar l-istopatoloġija (19). Hija disponibbli fuq is-sit tal-Internet pubbliku tal-OECD dwar il-Linji Gwida tat-Testijiet. Hija maħsuba biex tassisti lill-patoloġisti fl-eżamijiet tagħhom u tgħin biex tiżdied is-sensittività tal-analiżi. Varjetà ta' parametri nstab li kienu indikattivi ta' tossiċità relatata mal-endokrinali u ġew inkorporati fil-Metodu ta' Ttestjar. Parametri li għalihom kienet disponibbli dejta insuffiċjenti bħala prova ta' utilità jew li wrew biss evidenza dgħajfa fil-programm ta' validazzjoni tal-kapaċità tagħhom biex jgħinu fid-detezzjoni tal-interferenti endokrinali huma proposti bħala punti tat-tmiem fakultattivi (ara Appendiċi 2).

6. Abbażi ta' dejta ġġenerata fil-proċess ta' validazzjoni, għandu jkun enfasizzat li s-sensittività ta' din l-analiżi mhix suffiċjenti biex tidentifika s-sustanzi kollha b'modalitajiet ta' azzjoni (anti)androġeniċi jew (anti)estroġeniċi (9). Il-Metodu ta' Ttestjar ma jsirx fi stadju tal-ħajja li jkun l-aktar sensittiv għal taqlib endokrinali. Il-Metodu ta' Ttestjar, madankollu, matul il-proċess ta' validazzjoni identifika sustanzi li kienu jaffettwaw b'mod dgħajjef u b'saħħtu l-funzjoni tat-tirojde, u sustanzi endokrinali attivi f'saħħithom u moderati li kienu qed jaġixxu permezz ta' reċetturi ta' estroġenu jew androġenu, iżda kważi fil-każijiet kollha naqas milli jidentifika sustanzi endokrinali attivi li b'mod dgħajjef jaffettwaw reċetturi ta' estroġenu jew androġenu. Għalhekk ma jistax ikun deskritt bħala analiżi ta' tgħarbil għal attività endokrinali.

7. Konsegwentement, in-nuqqas ta' effetti relatati ma' dawn il-modalitajiet ta' azzjoni ma jistax jitqies bħala evidenza għan-nuqqas ta' effetti fuq is-sistema endokrinali. Fir-rigward tal-effetti medjati mis-sistema endokrinali, il-karatterizzazzjoni ta' sustanzi m'għandhiex, għalhekk, tkun ibbażata fuq ir-riżultati ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar waħdu iżda għandha tkun użata f'approċċ ta' piż ta' evidenza li jinkorpora d-dejta kollha eżistenti dwar kimika biex tkun ikkaratterizzata attività endokrinali potenzjali. Għal din ir-raġuni, it-teħid regolatorju tad-deċiżjonijiet dwar attività endokrinali (karatterizzazzjoni ta' sustanzi) għandu jkun approċċ fuq bażi wiesgħa, li ma jistrieħx biss fuq riżultati minn applikazzjoni ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

8. Huwa rrikonoxxut li l-proċeduri kollha bbażati fuq l-annimali jkunu konformi ma' standards lokali ta' kura tal-annimali; id-deskrizzjonijiet ta' kura u trattament li jinsabu hawn taħt huma standards minimi ta' prestazzjoni, u għandhom jeħdulhom posthom regolamenti lokali jekk ikunu aktar stretti. Gwida ulterjuri dwar it-trattament uman tal-annimali tingħata mill-OECD (14).

9. Id-definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Il-kimika għall-ittestjar hija amministrata oralment kuljum f'doži gradwati lil diversi gruppi ta' annimali għall-esperimenti, b'livell ta' doża waħda għal kull grupp għal perjodu ta' 28 jum. Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib, kull jum għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu bl-ewtanasja matul it-test issirilhom awtopsja u fit-tmiem tat-test l-annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu bl-ewtanasja u ssirilhom awtopsja. Studju ta' 28 jum jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' espożizzjoni orali ripetuta u jista' jindika l-ħtieġa ta' aktar

▼M4

studji ta’ aktar tul ta’ żmien. Jista’ jipprovdi wkoll informazzjoni dwar l-għażla ta’ konċentrazzjonijiet għal studji ta’ aktar tul ta’ żmien. Id-dejta derivata mill-użu tal-Metodu ta’ Ttestjar għandha tippermetti l-karatterizzazzjoni tat-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar, għall-indikazzjoni tar-reazzjoni tad-doża u d-determinazzjoni tal-Livell Bla Effett Ħażin Osservat (NOAEL).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta’ speċi ta’ annimali

11. L-ispeċi preferuta ta’ rodituri huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta’ rodituri. Għandha tingħata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f’dan il-Metodu ta’ Ttestjar B.7 ikunu investigati fi speċijiet oħra ta’ rodituri. Għalkemm huwa bijoloġikament plawżibbli li speċijiet oħra għandhom jirrispondu għal sustanzi tossiċi bl-istess mod bħall-far, l-użu ta’ speċijiet iżgħar jista’ jirriżulta f’aktar varjabbiltà minħabba sfidi tekniċi ta’ dissektjar ta’ organi iżgħar. Fil-programm internazzjonali ta’ validazzjoni għad-detezzjoni ta’ interferenti endokrinali, il-far kien l-unika speċi użata. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f’saħħithom ta’ razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. In-nisa m’għandhomx ikunu welldu u m’għandhomx jkunu tqal. Għandu jinbeda dożaġġ malli jkun fattibbli wara l-ftim, u, f’kull każ, qabel ma l-annimali ikollhom disa’ ġimgħat. Malli jinbeda l-istudju l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati għandha tkun minima u m’għandhiex taqbeż ± 20 % tal-piż medju taż-żewġ sessi. Meta tingħata doża orali ripetuta bħala preliminari għal studju ta’ aktar fit-tul, ikun preferibbli li l-annimali mill-istess razza u sors jintużaw fiż-żewġ studji.

Abitazzjoni u għalf

12. Il-proċeduri kollha għandhom ikunu konformi ma’ standards lokali tal-kura tal-annmali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma tkunx aktar minn 70 % għajr għal matul il-ħasil tal-kamra, il-mira għandha tkun ta’ 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, billi l-fotoperjodu jkun ta’ 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Fir-rigward tal-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta’ ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista’ tkun influwenzata mill-ħtieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta’ kimika għall-ittestjar meta tkun amministrata b’dan il-metodu. L-annimali għandhom jabitaw bħala grupp fi gruppi żgħar tal-istess sess; l-annimali jistgħu jabitaw individwalment jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Għal gruppi f’gaġeġ, m’għandux ikun hemm aktar minn ħames annimali jabitaw f’gaġġa waħda.

13. L-għalf għandu jkun analizzat regolarment għall-kontaminanti. Għandu jinżamm kampjun tad-dieta sakemm ikun iffinalizzat ir-rapport.

Preparazzjoni tal-annimali

14. L-annimali adulti żgħażagħ f’saħħithom ikunu assenjati b’mod każwali lill-gruppi ta’ kontroll u trattament. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b’mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista’ jkun hemm minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. L-annimali għandhom ikunu identifikati individwalment u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju tat-trattament biex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Preparazzjoni ta’ doži

15. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b’gavage (bil-forza) jew mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb. Il-metodu ta’ amministrazzjoni orali jkun jiddependi mill-għan tal-istudju, u mill-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi/tossikokinetiċi tal-kimika għall-ittestjar.

▼M4

16. Meta jkun meħtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinħall jew tiġi sospiża f'vejjikolu adattat. Huwa rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel għandu jitqies l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni fl-ilma, segwit minn konsiderazzjoni ta' soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'vejjikoli oħra. Għal vejjikoli oħra minbarra ilma l-karatteristiċi tossiċi tal-vejjikolu għandhom ikunu magħrufa. L-istabbiltà tal-kimika għall-ittestjar fil-vejjikolu għandha tkun iddeterminata.

PROĊEDURA

Għadd u sess tal-annimali

17. Mill-anqas 10 annimali (ħames nisa u ħames irġiel) għandhom ikunu użati fil-livell ta' kull doża. Jekk tkun ippjanata ewtanasja interim, l-għadd għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimalii li jinqatlu bl-ewtanasja qabel jitlesta l-istudju. Għandha tingħata konsiderazzjoni għal grupp satellitarju addizzjonali ta' għaxar annimali (ħamsa għal kull sess) fil-grupp ta' kontroll u f'dak tad-doża l-aktar għolja għall-osservazzjoni ta' riversibbiltà, persistenza jew okkorrenza mdewma ta' effetti tossiċi, għal mill-anqas 14-il jum wara it-trattament.

Dożaġġ

18. Ġeneralment, għandhom jintużaw mill-anqas tliet gruppi ta' test u grupp ta' kontroll, iżda jekk minn valutazzjoni ta' dejta oħra, ma jkunu mistennija l-ebda effetti f'doża ta' 1 000 mg/kg bw/d, ikun jista' jsir test ta' limitu. Jekk ma jkun hemm l-ebda dejta adattata disponibbli, jista' jsir studju dwar tiftix ta' firxa (annimali tal-istess razza u sors) bħala għajnuna għad-determinazzjoni tad-doži li jkollhom jintużaw. Ħlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom ikunu trattati b'mod identiku bħal tas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-ogħla volum użat.

19. Il-livelli tad-doża għandhom jintgħażlu billi titqies kull dejta eżistenti dwar it-tossiċità u (tossiko-) kinetika disponibbli għall-kimika għall-ittestjar u għal kimiċi relatati. L-ogħla livell ta' doża għandu jintgħażel bil-għan li jġib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija severa. Minn hemm 'il quddiem, għandha tintgħażel sekwenza dejjem tonqos tal-livelli tad-doża biex jintwera kull rispons relatat ma' dożaġġ u l-ebda effetti ħżiena osservati fl-aktar livell baxx tad-doża (NOAEL). Intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss ikunu l-aħjar biex ikunu stabbiliti l-livelli neżlin tad-doži, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test sikwit spiss hija preferibbli milli jintużaw intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

20. Meta jkun hemm tossiċità ġenerali osservata (eż. piż tal-ġisem ridott, effetti tal-fwied, qalb, pulmun jew kliewi, eċċ.) jew tibdiliet oħra li jistgħu ma jkunux risponsi tossiċi (eż. konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensittivi immunitarji, newroloġiċi jew endokrinali għandhon ikunu interpretati b'kawtela.

Test ta' limitu

21. Jekk test b'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum jew, għall-amministrazzjoni tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, ta' perċentwali ekwivalenti fid-dieta, jew ta' ilma tax-xorb (abbażi ta' determinazzjonijiet ta' piż tal-ġisem), billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi osservabbli u jekk ma tkunx mistennija tossiċità bbażata fuq dejta minn kimiċi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju sħiħ bl-użu ta' tliet livelli ta' doża jista' ma jitqisx li jkun meħtieġ. It-test ta' limitu japplika ħlief meta espożizzjoni umana tindika l-ħtieġa li jkollu jintuża livell ogħla ta' doża.

▼M4

Amministrazzjoni ta' doża

22. L-annimali jingħataw doża b'kimika għall-ittestjar kuljum 7 ijiem fil-ġimgħa għal perjodu ta' 28 jum. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b'gavage, dan għandu jsir b'doża waħda lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu tal-likwidu li jkun jista' jiġi amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet fl-ilma fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Ħlief għal kimiċi irritanti jew korruživi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

23. Għall-kimiċi amministrati permezz tad-dieta jew l-ilma tax-xorb, huwa importanti jkun żgurat li l-kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta jistgħu jintużaw konċentrazzjoni kostanti ta' dieta (ppm) jew livell wieħed kostanti ta' doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimali; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal kimika amministrata b'gavage, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili għal kull jum, u aġġustata kif meħtieġ biex jinżamm livell wieħed kostanti ta' doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal. Meta jintuża studju ta' doża ripetuta bħala preliminari għal studju fit-tul, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

Osservazzjonijiet

24. Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun ta' 28 jum. L-annimali fi grupp satellitarju skedati għall-osservazzjonijiet ta' segwitu għandhom jinżammu għal mill-anqas 14-il jum mingħajr trattament biex tinstab okkorrenza mdewma, jew persistenza ta', jew irkupru minn effetti tossiċi.

25. Osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-anqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin(ijiet) kull jum u jkun meqjus il-perjodu massimu tal-effetti antiċipati wara dożaġġ. Il-kundizzjoni tas-saħħa tal-annimali għandha tiġi rreġistrata. Mill-anqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha jiġu osservati għall-morbiditá u l-mortalitá.

26. Għal darba qabel l-ewwel espożizzjoni (biex jitħallew isiru paraguni skont is-suġġett), u mill-anqas darba fil-ġimgħa minn hemm 'il quddiem, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi dettaljati fl-annimali kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra mill-gaġġa ta' abitazzjoni f'arena standard u preferibbilment fl-istess ħin tal-jum f'kull okkażjoni. Għandhom ikunu rreġistrati sewwa, preferibbilment billi jintużaw sistemi ta' punti, iddefiniti espliċitament mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandu jsir sforz biex ikun żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test ikunu minimi u li l-osservazzjonijiet preferibbilment jitmexxew minn osservaturi li ma jkunux jafu bit-trattament. Sinjali nnotati għandhom jinkludu, iżda ma jkunux limitati għal, bidliet fil-ġilda, pil, għajnejn, membrani mukuži, okkorrenza ta' sekrezzjonijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż. dmugħ, erezzjoni tal-pil, daqs tal-pupilli, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Bidliet fil-mixja, qagħda u rispons għal immaniġġar, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv) jew imġiba biżarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (2).

27. Fir-raba' ġimgħa ta' espożizzjoni għandhom isiru valutazzjoni tar-reattività sensorja għal stimuli ta' tipi differenti (2) (eż. stimuli tas-smigħ, viżivi u proprjoċettivi) (3)(4)(5), valutazzjoni tal-qawwa tal-qabda (6) u tal-attività motorja (7). Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda, jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi.

▼M4

28. Osservazzjonijiet funzjonali magħmulin fir-raba' ġimgħa ta' espożizzjoni jistgħu jitħallew barra meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju subkroniku (ta' 90 jum) sussegwenti. F'dak il-każ, l-osservazzjonijiet funzjonali għandhom ikunu inklużi f'dan studju ta' segwitu. Min-naħa l-oħra, id-disponibbiltà ta' dejta dwar osservazzjonijiet funzjonali mill-istudju ta' doża ripetuta tista'ssaħħaħ il-kapaċità biex jintgħażlu dożi għal studju subkroniku sussegwenti.

29. Bħala eċċezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu wkoll jitħallew barra għal gruppi li xort'oħra juru sinjali ta' tossiċità tant li tfixkel b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.

30. F'awtopsja, iċ-ċiklu estruż tan-nisa kollha jista' jiġi ddeterminat (b'mod fakultattiv) billi jittieħdu tiċpisiet (smears) vaġinali. Dawn l-osservazzjonijiet se jipprovdu informazzjoni dwar l-istadju taċ-ċiklu estruż meta jsir il-qtil u jgħinu fl-evalwazzjoni istoloġika ta' tessuti sensittivi tal-estroġenu [ara l-gwida dwar l-istopatoloġija (19)].

Piż tal-ġisem u konsum tal-ikel/ilma

31. L-annimali kollha għandhom jintiżnu mill-anqas darba fil-ġimgħa. Il-kejlijiet tal-konsum tal-ikel għandu jsir mill-anqas kull ġimgħa. Jekk il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu wkoll jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa.

Ematoloġija

32. L-eżamijiet ematoloġiċi li ġejjin għandhom isiru fit-tmiem tal-perjodu tat-test: ematokrit, konċentrazzjonijiet tal-emoglobina, għadd ta' eritroċiti, retikuloċiti, għadd totali u differenzjali ta' lewkoċiti, għadd ta' pjastrini u kejl ta' ħin/potenzjal għal emboliżmu. Determinazzjonijiet oħra li għandhom isiru, jekk il-kimika għall-ittestjar jew il-metaboliti putattivi tagħha jkollhom jew ikunu ssuspettati li jkollhom proprjetajiet ossidanti, jinkludu konċentrazzjoni ta' metemoglobina u l-korpi ta' Heinz.

33. Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn sit imsemmi eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtanasja tal-annimali, u għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. L-annimali għandhom jinżammu msajmin tul il-lejl qabel l-ewtanasja ([1]).

Bijokimika klinika

34. Id-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika għall-investigazzjoni tal-effetti tossiċi maġġuri f'tessuti u, speċifikatament, ta' effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demm miksubin mill-annimali kollha eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtanasja tal-annimali (minbarra dawk misjubin moribondi u/jew li jinqatlu bl-ewtanasja qabel ma jintemm l-istudju). Investigazzjonijiet ta' plażma jew serum għandhom jinkludu sodju, potassju, glukożju, kolesterol totali, urea, kreatinina, proteina totali u albumina, mill-anqas żewġ enzimi indikattivi ta' effetti epatoċellulari (bħal alanin aminotransferaži, aspartate aminotransferaži, fosfataži alkalina, γ-glutamil trans-peptidase u glutamat ta' deidroġenaži), u aċidi tal-biljari. Il-kejl ta' enzimi addizzjonali (ta' oriġini epatika jew oriġinijiet oħra) u ta' bilirubina jistgħu jipprovdu informazzjoni utli f'ċerti ċirkostanzi.

35. B'mod fakultattiv, id-determinazzjonijiet ta' analiżi tal-awrina jistgħu jsiru matul l-aħħar ġimgħa tal-istudju bl-użu ta' ġbir ta' volum ta' awrina li jkun itteħdilha l-ħin; dehra, volum, ożmolalità jew gravità speċifika, pH, proteina, glukożju u demm/ċelluli tad-demm.

([1]) Għal għadd ta' kejlijiet ta' serum u plażma, l-aktar għall-glukożju, is-sawm tul il-lejl ikun ippreferut. Ir-raġuni ewlenija għal din il-preferenza hija li aktar varjabbiltà li għandha inevitabbilment tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, għandha tendenza li taħbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċli. Min-naħa l-oħra, iżda, is-sawm tul il-lejl jista' joħloq interferenza fil-metaboliżmu ġenerali tal-annimali u, partikolarment fl-istudji dwar l-għalf, jista' jiddisturba l-espożizzjoni ta' kuljum għall-kimika għall-ittestjar. Jekk ikun adottat sawm tul il-lejl, id-determinazzjonijiet bijokimiċi kliniċi għandhom isiru wara li jkunu twettqu l-osservazzjonijiet funzjonali fir-raba' (4) ġimgħa tal-istudju.

▼M4

36. Flimkien ma' dan, għandhom jitqiesu studji biex ikunu investigati markaturi ta' plażma jew serum ta' ħsara ġenerali għal tessuti. Determinazzjonijiet oħra li għandhom isiru, jekk il-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar ikunu jistgħu jew ikunu ssuspettati li jaffettwaw profili metaboliċi relatati, jinkludu kalċju, fosfat, trigliċeridi, ormoni speċifiċi u kolinesteraži. Dawn jeħtiġilhom ikunu identifikati għal kimiċi f'ċerti klassijiet jew abbaži ta' każ każ.

37. Għalkemm fl-evalwazzjoni internazzjonali tal-punti ta' tmiem relatati mal-endokrinali ma setax jintwera vantaġġ ċar għad-determinazzjoni tal-ormoni tat-tirojde (T3, T4) u TSH, jista' jkun utli li jinżammu kampjuni ta' plażma jew serum biex jitkejlu T3, T4 u TSH (fakultattivi) jekk ikun hemm indikazzjoni ta' effett fuq l-assi pitwitarja-tirojde. Dawn il-kampjuni jistgħu jkunu ffriżati f'- 20° għall-ħżin. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-konċentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:

— il-ħin tal-qatla minħabba varjazzjonijiet tul il-jum tal-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— il-metodu tal-qatla biex tkun evitata tensjoni bla bżonn għall-annimali li tista' taffettwa l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— is-settijiet tat-testijiet għad-determinazzjonijiet tal-ormoni li jistgħu jkunu differenti mill-kurvi standard tagħhom.

L-identifikazzjoni definittiva ta' kimiċi tat-tirojde attiva hija l-aktar affidabbli b'analiżi istopatoloġika milli bil-livelli tal-ormoni.

38. Kampjuni ta' plażma maħsubin speċifikatament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f'ħin komparabbli tal-jum. Huwa rrakkomandat li tingħata konsiderazzjoni lid-determinazzjonijiet ta' T3, T4 u TSH mibdija bbażati fuq alterazzjonijiet ta' istopatoloġija tat-tirojde. Il-valuri numeriċi miksubin meta jkunu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta' analiżi kummerċjali. Għaldaqstant, jista' ma jkunx possibbli li jkunu pprovduti kriterji ta' prestazzjoni bbażati fuq dejta storika uniformi. Alternattivament, il-laboratorji għandhom jagħmlu sforzi biex iżommu koeffiċjenti ta' kontroll ta' varjazzjoni taħt 25 għal T3 u T4 u taħt 35 għal TSH. Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom ikunu rreġistrati f'ng/ml.

39. Jekk baži tad-dejta storika ma tkunx adegwata, għandha tingħata konsiderazzjoni lid-determinazzjoni ta' varjabbli ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel ma jibda d-dożaġġ jew preferibbilment f'sett ta' annimali mhux inklużi fil-gruppi ta' esperimenti.

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

40. L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-testikoli, l-epididimi, il-prostata + il-bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni kollha flimkien, it-timu, il-milsa, il-moħħ u l-qalb tal-annimali kollha (minbarra ta' dawk misjubin moribondi u/jew li jinqatlu bl-ewtanasja qabel ma intemm l-istudju) għandhom jintraqmu minn kull tessut imwaħħal magħhom, kif jixraq, u l-piż tagħhom fl-imxarrab għandu jittieħed malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni biex ikun evitat it-tnixxif. Għandha tkun eżerċitata attenzjoni meta jsir it-tirqim tal-kumpless tal-prostata biex ikun evitat li jittaqqbu l-bżieżaq seminali mimlijin fluwidu. Alternattivament, il-bżieżaq seminali u l-prostata jistgħu jintraqmu u jintiżnu wara l-fissazzjoni.

▼M4

41. Flimkien ma' dan, żewġ tessuti oħra jistgħu, imma mhux bilfors, jintiżnu malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni, biex ikun evitat it-tnixxif: ovarji akkoppjati (piż fl-imxarrab) u l-utru, inkluż iċ-ċerviċi (il-gwida dwar it-tneħħija u l-preparazzjoni tat-tessuti tal-utru għal-kejl tal-piż hija pprovduta fit-TG 440 tal-OECD (18)).

42. Il-piż tat-tirojde (fakultattiv) jista' jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirqim għandu jsir ukol b'reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-ħsara lit-tessut. Il-ħsara fit-tessut tista' tippreġudika analiżi istopatoloġika.

43. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati f'midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (ara l-paragrafu 47): il-leżjonijiet kbar kollha, il-moħħ (reġjuni rappreżentattivi inklużi ċ-ċerebru, iċ-ċervellett u l-mežoċefalu), in-nerv vertebrali, l-għajnejn, l-istonku, l-imsaren żgħar u kbar (inklużi l-irqajja' ta' Peyer), il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-timu, it-tirojde, it-trakea u l-pulmuni (ippreservati b'inflazzjoni b'fissattiv u wara b'immersjoni), il-gonadi (testikoli u ovarji), l-organi sesswali aċċessorji (utru u ċerviċi, epididimi, prostata u bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni), il-vaġina, il-bużżieqa tal-awrina, in-nodi limfatiċi [minbarra n-nodu ta' tisfija l-aktar qrib għandu jittieħed nodu limfatiku ieħor skont il-prassi tal-laboratorju (15)], in-nerv periferali (xjatiku jew tibjali) preferibbilment qrib ħafna tal-muskolu, il-muskolu skeletali u l-għadam, bil-mudullun tal-għadam (taqsima jew, alternattivament, aspirat tal-mudullun tal-għadam imqieġħed frisk). Huwa rrakkomandat li t-testikoli jkunu ffissati b'immersjoni f'fissattiv ta' Bouin jew f'dak modifikat ta' Davidson (16) (17). It-tunika albuġinea għandha tittaqqab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b'labra biex jitħalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar.

44. It-tessuti li ġejjin jistgħu jagħtu indikazzjoni siewja tal-effetti relatati mal-endokrinali: Il-gonadi (ovarji u testikoli), organi sesswali aċċessorji (l-utru inkluż iċ-ċerviċi, l-epididimi, il-bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni, il-prostata dorsolaterali u l-ventrali), il-vaġina, il-pitwitarja, il-glandola mammarja tar-raġel, il-glandola tirojde u l-adrenali. Il-bidliet fil-glandoli mammarji tar-raġel ma kinux iddokumentati b'mod suffiċjenti iżda dan il-parametru jista' jkun sensittiv ħafna għal sustanzi b'azzjoni estroġenika. L-osservazzjoni ta' organi/tessuti li mhumiex elenkati fil-paragrafu 43 hija fakultattiva (ara l-Appendiċi 2).

45. Il-Gwida dwar l-istopatoloġija (19) tagħti aktar informazzjoni dwar id-dissezzjoni, fissazzjoni, tqassim f'taqsimiet u l-istopatoloġija ta' tessuti endokrinali.

46. Fil-programmm tat-test internazzjonali nkisbet xi evidenza li effetti endokrinali sottili minn kimiċi b'qawwa baxxa biex jaffettwaw l-omeostaži tal-ormon sesswali jistgħu jkunu identifikati bid-disturb tas-sinkronizzazzjoni taċ-ċiklu estruż f'tessuti differenti u mhux daqshekk b'alterazzjonijiet istopatoloġiċi sfaċċati f'organi sesswali tal-mara. Għalkemm ma nkisbet l-ebda prova definittiva għall-effetti bħal dawn, huwa rrakkomandat li evidenza ta' asinkronija li jista' jkun hemm taċ-ċiklu estruż għandha titqies fl-interpretazzjoni tal-istopatoloġija tal-ovarji (ċelluli follikulari, tekali u mrammlin), tal-utru, taċ-ċerviċi u tal-vaġina. Jekk ikun ivvalutat, l-istadju taċ-ċiklu kif iddeterminat minn tiċpisiet vaġinali jista' jkun inkluż ukoll f'dan il-paragun.

▼M4

Istopatoloġija

47. Għandha ssir istopatoloġija sħiħa fuq l-organi u t-tessuti ppreservati tal-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doża għolja. Dawn l-eżamijiet għandhom ikunu estiżi għal annimali tal-gruppi l-oħra kollha ta' dożaġġ, jekk ikunu osservati bidliet relatati ma' trattament fil-grupp ta' doża għolja.

48. Il-leżjonijiet kbar kollha għandhom ikunu eżaminati.

49. Meta jintuża grupp satellitarju, l-istopatoloġija għandha ssir fuq tessuti u organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi ttrattati.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

50. Għandha tkun ipprovduta dejta individwali. Addizzjonalment, id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali fil-bidu tat-test, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu bl-ewtanasja għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kull mewta jew ewtanasja, l-għadd li juri sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż il-waqt meta jfaqqgħu, kemm idumu u kemm ikun sever kull effett tossiku, l-għadd ta' annimali li juru leżjonijiet, it-tip ta' leżjonijiet, is-severità tagħhom u l-perċentwali tal-annimali li juru kull tip ta' leżjoni.

51. Meta jkun possibbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-paraguni tal-effett tul firxa tad-doża għandhom jevitaw l-użu ta' testijiet-t multipli. Il-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju.

52. Għall-kontroll tal-kwalità huwa propost li tinġabar dejta storika ta' kontroll u li għad-dejta numerika jkunu kkalkulati l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni, speċjalment għall-parametri li jkollhom rabta ma' detezzjoni ta' interferent endokrinali. Din id-dejta tista' tintuża għal finijiet ta' paragun meta jkunu evalwati studji attwali.

Rapport tat-test

53. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

— natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni.

Vejjikolu (fejn xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu, jekk ma jkunx ilma.

Annimali tat-test:

— speċi/razza użata;

— għadd, età u sess tal-annimali;

— sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;

— piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

— ġustifikazzjoni għal speċi jekk ma jkunx far

Kundizzjonijiet tat-test:

— motiv għall-għażla tal-livell ta' doża;

— dettalji tal-formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta, konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;

▼**M4**

— dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— konverżjoni minn dieta/konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Punti ta' tmiem fakultattivi investigati

— lista ta' punti ta' tmiem fakultattivi investigati

Riżultati:

— piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk applikabbli;

— dejta ta' reazzjoni tossika skont is-sess u livell ta' doża, inklużi sinjali ta' tossiċità;

— natura, severità u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);

— attività sensorja, qawwa tal-qabda u valutazzjonijiet tal-attività motorja;

— testijiet ematoloġiċi b'valuri bażi rilevanti;

— testijiet ta' bijokimika klinika b'valuri linja bażi rilevanti;

— piż tal-ġisem waqt l-ewtanasja u dejta dwar il-piżijiet tal-organi;

— sejbiet minn awtopsji;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha istopatoloġiċi;

— dejta ta' assorbiment jekk disponibbli;

— trattament ta' statistika ta' riżultati, fejn jixraq.

Diskussjoni dwar riżultati.

Konklużjonijiet

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Androġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bħal ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T_3) f'organiżmu mammiferu.

Dożaġġ huwa terminu ġenerali li jinkludi doża, il-frekwenza tagħha u d-durata ta' dożaġġ.

Doża hija l-ammont ta' kimika għall-ittestjar amministrata. Id-doża hija espressa bħala piż tal-kimika għall-ittestjar għal kull unità ta' piż tal-ġisem ta' annimal tat-test għal kull jum (eż. mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jew bħala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Tossiċità evidenti huwa terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun ġiet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu and għandhom ikunu tali li żieda fid-doża amministrata tista' tkun mistennija li tirriżulta fl-iżvilupp ta' sinjali ta' tossiċità estrema u probabbilment mortalità.

NOAEL hija l-abbrevjazzjoni għall-livell bla effett ħażin osservat. Dan huwa l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet ħżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minħabba trattament.

Estroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bħal ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Attività tat-tirojde hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bħal ormon naturali tat-tirojde (eż. T_3) f'organiżmu mammiferu.

Validazzjoni hija proċess xjentifiku mfassal biex jikkaratterizza r-rekwiżiti operattivi u l-limitazzjonijiet ta' metodu ta' ttestjar u biex juri l-affidabbiltà u r-rilevanza tiegħu għal għan partikolari.

▼M4

Appendiċi 2

Punti ta' tmiem rakkomandati għall-detezzjoni ta' interferenti endokrinali (EDs) f'dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7

Punti ta' tmiem obbligatorji	Punti ta' tmiem fakultattivi
Piż	
— Testikoli — Epididimi — Adrenali — Prostata + bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni	— Ovarji — Utru, inkluż ċerviċi — Tirojde
Istopatoloġija	
— Gonadi: — Testikoli u — Ovarji — Organi sesswali aċċessorji: — Epididimi, — Prostata + bużżieqa seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni — Utru, inkluż ċerviċi — Adrenali — Tirojde — Vaġina	— Tiċpisiet vaġinali — Glandoli mammarji tar-raġel — Pitwitarja
Kejl ta' ormoni	
	— Livelli ta' ċirkolazzjoni ta' T3, T4 — Livelli ta' ċirkolazzjoni ta' TSH

LETTERATURA:

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼M4

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/-MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE u Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. TOSSIĊITÀ TA’ INALAZZJONI SUBAKUTA: STUDJU TA’ 28 JUM

SOMMARJU

Dan il-Metodu ta’ Ttestjar B.8 rivedut tfassal biex jikkaratterizza b’mod sħiħ it-tossiċità ta’ kimika għall-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni wara espożizzjoni ripetuta għal perjodu limitat ta’ żmien (28 jum), u biex jipprovdi dejta għal valutazzjonijiet tar-riskju ta’ inalazzjoni kwantitattiva. Gruppi ta’ mill-anqas 5 rġiel u 5 nisa rodituri jkunu esposti 6 siegħat kuljum għal 28 jum għal a) il-kimika għall-ittestjar fi tliet livelli jew aktar ta’ konċentrazzjoni, b) arja filtrata (kontroll negattiv), u/jew c) il-vejjikolu (kontroll ta’ vejjikolu). L-annimali jkunu esposti ġeneralment għal 5 ijiem fil-ġimgħa iżda espożizzjoni għal 7 ijiem fil-ġimgħa hija wkoll permessa. L-iġiel u nisa jkunu dejjem ittestjati, iżda jkunu jistgħu jiġu esposti f’livelli differenti ta’ konċentrazzjoni jekk ikun magħruf li sess wieħed ikun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar. Dan il-metodu jippermetti lid-direttur tal-istudju jkun flessibbli biex jinkludi gruppi satellitarji (riversibbli), ħasil tal-bronkoalveolari (BAL), testijiet newroloġiċi u patoloġija klinika addizzjonali u evalwazzjonijiet istopatoliġiċi biex it-tossiċità ta’ kimika għall-ittestjar tkun ikkaratterizzata aħjar.

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta’ Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test 412 (2009) tal-OECD. Il-Linja Gwida tat-Test 412 (TG 412) oriġinali dwar inalazzjoni subakuta kienet adottata fl-1981 (1). Dan il-Metodu ta’ Ttestjar B.8 (bħala ekwivalenti għat-TG 412 riveduta) kien aġġornat biex jirrifletti l-istat tax-xjenza u biex jissodisfa l-ħtiġijiet regolatorji preżenti u futuri.

2. Dan il-metodu jgħin biex ikunu kkaratterizzati effetti ħżiena wara espożizzjoni ripetuta kuljum ta’ inalazzjoni għal kimika għall-ittestjar għal 28 jum. Id-dejta derivata minn studji dwar tossiċità ta’ inalazzjoni subakuta tista’ tintuża għal valutazzjonijiet tar-riskji kwantitattivi [jekk ma jkunux segwiti minn studju ta’ 90 jum dwar tossiċità ta’ inalazzjoni subkronika (Kapitolu B.29 ta’ dan l-Anness)]. Id-dejta tista’ tipprovdi wkoll informazzjoni dwar l-għażla ta’ konċentrazzjonijiet għal studji għal aktar fit-tul bħall-istudju ta’ 90 jum dwar it-tossiċità ta’ inalazzjoni subkronika. Dan il-Metodu ta’ Ttestjar mhux maħsub speċifikatament għall-ittestjar ta’ nanomaterjali. Id-definizzjonijiet użati fil-kuntest ta’ dan il-Metodu ta’ Ttestjar huma pprovduti fl-aħħar ta’ dan il-kapitolu u fid-Dokument ta’ Gwida 39 (2).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

3. L-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju biex tissaħħaħ il-kwalità tal-istudju u biex l-użu tal-annimali jkun mill-anqas. L-informazzjoni li għandha tassisti fl-għażla ta’ konċentrazzjonijiet ta’ testijiet adatti tista’ tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta’ kwalunkwe test ta’ tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli u dejta tossikoloġika dwar kimiċi relatati strutturalment; u dejta derivata minn ittestjar tat-tossiċità ta’ inalazzjoni akuta. Jekk tkun mistennija jew osservata newrotossiċità waqt li jkun għaddej l-istudju, id-direttur tal-istudju jista’ jagħżel li jinkludi evalwazzjonijiet xierqa bħal gaġġa funzjonali ta’ osservazzjoni (FOB) u kejl ta’ attività motorja. Għalkemm l-għażla sewwa tal-ħin ta’ espożizzjonijiet relattivi għal eżamijiet speċifiċi tista’ tkun kritika, il-prestazzjoni ta’ dawn l-attivitajiet addizzjonali m’għandhiex tfixkel id-disinn bażiku tal-istudju.

▼M4

4. Id-dilwizzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar korrużivi jew irritanti jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet li għandhom jirrendu l-grad mixtieq ta' tossiċità [irreferi għal GD 39 (2)]. Meta l-annimali jkunu esposti għal dawn il-materjali, il-konċentrazzjonijiet immirati għandhom ikunu baxxi biżżejjed li ma joħolqux uġigħ kbir u diffikultà, iżda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta' konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilħqu l-għan regolatorju u xjentifiku tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jintgħażlu abbażi ta' każ każ, preferibbilment imsejsa fuq studju mfassal b'mod adegwat ta' detezzjoni ta' firxa li jipprovdi informazzjoni dwar il-punt ta' tmiem kritiku, dwar kull livell limitu ta' irritazzjoni u dwar il-ħin ta' meta beda (ara l-paragrafi 11-13). Għandha tingħata l-ġustifikazzjoni għall-għażla ta' konċentrazzjoni.

5. L-annimali moribondi jew annimali li jkunu jidhru li jkunu muġugħa jew li juru sinjali ta' diffikultà severa u fit-tul għandhom jinqatlu b'mod uman. L-annimali moribondi jitqiesu bl-istess mod bħal annimali li jmutu waqt it-test. Il-kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni li jinqatlu annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu ħafna, u gwida biex ikun magħruf meta l-mewt tkun tista' titbassar jew tkun waslet qrib ħafna, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' Speċi tal-Annimali

6. Għandhom jintużaw rodituri adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi preferuta hija l-far. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw speċijiet oħra.

Preparazzjoni tal-annimali

7. Nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal. Fil-jum li fih jintgħażlu b'mod każwali, l-annimali għandhom ikunu adulti żgħażagħ li jkunu minn 7 sa 9 ġimgħat fl-età. Il-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' ±20 % tal-piż medju għal kull sess. L-annimali jintgħażlu b'mod każwali, jiġu mmarkati għal identifikazzjoni individwalment, u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 ijiem qabel ma jibda t-test biex jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Trobbija tal-annimali

8. L-annimali għandhom ikunu identifikati individwalment, jekk ikun possibbli bi transponders taħt il-ġilda, biex ikunu ffaċilitati l-osservazzjonijiet u tkun evitata l-konfużjoni. It-temperatura tal-kamra ta' manutenzjoni tal-annimali esperimentali għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara l-espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-għadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull annimal u għandu jimminimizza t-telf minħabba kannibaliżmu u ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieħer biss, jista' jkun jeħtieġ ilhom jidraw it-tubi ta' trażżin. It-tubi ta' trażżin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusklu. Jekk tkun disponibbli dejta ġenerika li turi li ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa ċertu limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx meħtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trażżin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jitħallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' sħabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, ħlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

▼M4

Kmamar tal-inalazzjoni

9. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-oġġett tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-modalità ppreferuta ta' espożizzjoni hija mill-imnieħer biss (liema fraži tinkludi r-ras biss, l-imnieħer biss, jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieħer biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu aħjar billi tintuża modalità ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu, iżda dan għandu jkun iġġustifikat fir-rapport tal-istudju. Biex tkun żgurata stabbiltà tal-atmosfera meta tintuża kamra għall-ġisem kollu, "il-volum" totali tal-annimali tat-test m'għandux ikun aktar minn 5 % tal-volum tal-kamra. Il-prinċipji ta' tekniki ta' espożizzjoni mill-imnieħer biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma indirizzati f'GD 39 (2).

STUDJI DWAR IT-TOSSIĊITÀ

Konċentrazzjonijiet limitati

10. B'differenza minn studji akuti, m'hemmx konċentrazzjonijiet limitati ddefiniti fi studji ta' 28 jum dwar tossiċità ta' inalazzjoni subakuta. Il-konċentrazzjoni massima ttestjata għandha tqis: 1) il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb, 2) il-livell ta' "l-agħar każ" ta' espożizzjoni umana, 3) il-ħtieġa li tinżamm provvista adegwata ta' ossiġenu, u/jew 4) konsiderazzjonijiet ta' trattament xieraq tal-annimali. Fin-nuqqas ta' limiti abbażi ta' dejta, jistgħu jintużaw il-limiti akuti tar-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (13) (jiġifieri sa konċentrazzjoni massima ta' 5 mg/l għal aerosols, 20 mg/l għal fwar u 20 000 ppm għal gassijiet); irreferi għal GD 39 (2). Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk ikun meħtieġ li dawk il-limiti jinqabżu meta jkunu ttestjati gassijiet jew kimiċi għall-ittestjar volatili ħafna (eż. refriġeranti). Il-konċentrazzjoni limitata għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolqot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

Studju dwar id-Detezzjoni ta' Firxa

11. Qabel ma jingħata bidu għall-istudju ewlieni, jista' jkun meħtieġ li jsir studju dwar l-detezzjoni ta' firxa. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa huwa aktar komprensiv minn studju ta' osservazzjoni minħabba li mhux limitat għal għażla ta' konċentrazzjonijiet. It-tagħlim li hemm x'wieħed jieħu minn studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jwassal biex l-istudju ewlieni jirnexxi. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista', pereżempju, jipprovdi informazzjoni teknika dwar metodi analitiċi, teħid tad-daqs ta' partiċelli, sejbien ta' mekkaniżmi tossiċi, patoloġija klinika u dejta istopatoloġika u stimi ta' x'jista' jkunu konċentrazzjonijiet ta' NOAEL u MTC fi studju ewlieni. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża l-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa biex jidentifika l-limitu tal-irritazzjoni tas-sistema respiratorja (eż. bl-istopatoloġija tas-sistema respiratorja, l-ittestjar tal-funzjoni pulmonarja jew il-ħasil tal-bronkoalveolari), il-konċentrazzjoni ogħla li hija tollerata mingħajr tensjoni bla bżonn għall-annimali, u l-parametri li għandhom jikkaratterizzaw bl-aħjar mod it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar.

12. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jikkonsisti f'livell wieħed jew aktar ta' konċentrazzjonijiet. M'għandhomx ikunu esposti aktar minn tliet irġiel u tliet nisa f'kull livell ta' konċentrazzjoni. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa għandu jdum mill-anqas 5 ijiem u ġeneralment mhux aktar minn 14 jum. Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet għall-istudju ewlieni għandu jingħata fir-rapport ta' studju. L-għan tal-istudju ewlieni huwa li tintwera relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons ibbażata fuq dak li huwa mistenni li jkun l-aktar punt ta' tmiem sensittiv. Il-konċentrazzjoni baxxa għandha idealment tkun konċentrazzjoni ta' ebda effett ħażin osservat, filwaqt li l-konċentrazzjoni għolja għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolqot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

▼M4

13. Meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni għall-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa, l-informazzjoni kollha disponibbli għandha titqies li tinkludi relazzjonijiet ta' attività strutturata u dejta għal kimiċi simili (ara l-paragrafu 3). Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jivverifika/jirrifjuta dawk li jitqiesu li jkunu l-punti ta' tmiem l-aktar sensittivi bbażati b'mod mekkaniku, eż. inibizzjoni ta' kolinesteraži minn organofosfati, formazzjoni ta' metemoglobina minn aġenti eritroċitotossiċi, ormoni tat-tirojde (T3, T4) għal tirotossikanti, proteina, LDH, jew newtrofili f'ħasil tal-bronkoalveolari għal partiċelli li ftit jinħallu li ma jagħmlux ħsara jew aerosols li jirritaw il-pulmun.

Studju Ewlieni

14. L-istudju ewlieni dwar tossiċità subakuta ġeneralment jikkonsisti fi tliet livelli ta' konċentrazzjoni, u wkoll kontrolli konkurrenti negattivi (arja) u/jew ta' vejjikoli skont il-ħtieġa (ara l-paragrafu 17). Id-dejta kollha disponibbli għandha tkun utilizzata bħala għajnuna fl-għażla ta' livelli adatti ta' espożizzjoni, inklużi r-riżultati ta' studji sistemiċi ta' tossiċità, metaboliżmu u kinetika (għandha ssir enfaži partikolari biex ikunu evitati livelli għoljin ta' konċentrazzjoni li jissaturaw proċessi kinetiċi). Kull grupp ta' test ikollu fih mill-anqas 10 rodituri (5 rġiel u 5 nisa) li jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar għal 6 sigħat kuljum fuq bażi ta' 5 ijiem fil-ġimgħa għal perjodu ta' 4 ġimgħat (l-istudju jdum b'kollox 28 jum). L-annimali jistgħu wkoll ikunu esposti 7 ijiem fil-ġimgħa (eż. meta l-ittestjar ikun ħa farmaċewtiċi man-nifs). Jekk ikun magħruf li wieħed miż-żewġ sessi jkun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar, is-sessi jkunu jistgħu jiġu esposti f'livelli differenti ta' konċentrazzjoni biex isir l-aħjar użu mill-konċentrazzjoni-rispons kif deskritt fil-paragrafu 15. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta l-espożizzjoni ddum anqas minn 6 sigħat/jum, jew meta jkun meħtieġ li jsir studju ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu li jdum aktar (eż. 22 siegħa/jum) [irreferi għal GD 39 (2)]. M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzzjoni sakemm espożizzjoni ma ddumx aktar minn 6 sigħat. Jista' jingħata ilma matul l-espożizzjoni kollha tal-ġisem kollu.

15. Il-konċentrazzjonijiet immirati magħżulin għandhom jidentifikaw l-organu/i mmirat(i) u juru konċentrazzjoni-rispons ċari:

— Il-livell għoli ta' konċentrazzjoni għandu jirriżulta f'effetti tossiċi iżda m'għandux jikkawża sinjali jew letalità li jdumu u li ma jħallux li ssir evalwazzjoni li tagħmel sens.

— Il-livell(i) intermedju/i ta' konċentrazzjoni għandhom ikunu spazjati biex jipproduċu gradazzjoni ta' effetti tossiċi bejn dawk tal-konċentrazzjoni baxxa u dawk tal-konċentrazzjoni għolja.

— Il-livell baxx ta' konċentrazzjoni għandu jipproduċi ftit jew ebda evidenza ta' tossiċità.

Studju satellitarju (Riversibbiltà)

16. Studju satellitarju (riversibbiltà) jista' jintuża biex ikunu osservati r-riversibbiltà, il-persistenza jew l-okkorrenza mdewma ta' tossiċità għal perjodu ta' wara t-trattament ta' tul xieraq, iżda ta' mhux anqas minn 14-il jum. Gruppi satellitarji (riversibbli) jikkonsistu f'ħames irġiel u ħames nisa esposti kontemporanjament mal-annimali tal-esperimenti fl-istudju ewlieni. Gruppi ta' studju satellitarju (riversibbli) għandhom ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar fl-ogħla livell ta' konċentrazzjoni u għandu jkun hemm arja konkurrenti u/jew kontrolli ta' vejjikoli skont il-ħtieġa (ara l-paragrafu 17).

▼M4

Annimali tal-Kontroll

17. L-annimali tal-kontroll negattiv (arja) konkurrenti għandhom ikunu mmaniġġati b'mod identiku għall-grupp ta' annimali tat-test ħlief li huma jkunu esposti għal arja filtrata milli għal kimika għall-ittestjar. Meta l-ilma jew sustanza oħra jintużaw biex jassistu il-ġenerazzjoni tal-atmosfera tat-test, fl-istudju għandu jkun inkluż grupp ta' kontroll ta' vejjikoli, minflok grupp ta' kontroll negattiv (arja). Kull meta jkun possibbli għandu jintuża l-ilma bħala l-vejjikolu. Meta l-ilma jintuża bħala l-vejjikolu, l-annimali ta' kontroll għandhom ikunu esposti għall-arja bl-istess umdità relattiva bħal tal-gruppi esposti. L-għażla ta' vejjikolu adattat għandha tkun ibbażata fuq studju minn qabel immexxi sewwa jew fuq dejta storika. Jekk it-tossiċità ta' vejjikolu ma' tkunx magħrufa sewwa, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża kemm kontroll negattiv (arja), kif ukoll kontroll ta' vejjikolu, iżda dan għandu jkun skuraġġit bil-qawwa. Jekk dejta storika turi li vejjikolu ma jkunx tossiku, f'dak il-każ ma jkunx hemm ħtieġa għal grupp ta' kontroll negattiv (arja) u għandu jintuża biss kontroll ta' vejjikolu. Jekk studju minn qabel ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma turi ebda tossiċità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata u għandu jintuża dan il-kontroll ta' vejjikolu.

KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Amministrazzjoni ta' Konċentrazzjonijiet

18. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew taħlita tagħhom. L-istat fiżiku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fiżika li x'aktarx tkun preżenti matul l-immaniġġar u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet esplussivi. Il-materjal tal-partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli. Hija pprovduta gwida ulterjuri f'GD 39 (2).

Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Partiċelli

19. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex titħalla jkun hemm espożizzjoni tar-reġjuni kollha rilevanti tas-sistema respiratorja, huma rrakkomandati aerosols b'dijametri aerodinamiċi ta' medjan ta' massa (MMAD) f'firxa minn 1 sa 3 μm b'devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g) fil-firxa ta' 1,5 sa 3,0 (4). Għalkemm għandu jsir sforz raġonevoli biex dan l-istandard jintlaħaq, għandu jkun ipprovdut ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, il-partiċelli tad-dħaħen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u l-partiċelli u fibri ċċarġjati jistgħu jaqbżuh.

Preparazzjoni tal-Kimika għall-Ittestjar f'Vejjikolu

20. Idealment, il-kimika għall-ittestjar għandha tiġi ttestjata mingħajr vejjikolu. Jekk ikun meħtieġ jintuża vejjikolu biex ikunu ġġenerati l-konċentrazzjoni adattata tal-kimika għall-ittestjar u d-daqs tal-partiċelli, l-ilma għandu jingħata preferenza. Kull darba li kimika għall-ittestjar tinħall f'vejjikolu, l-istabbiltà tagħha għandha tintwera.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJIET TAL-ESPOŻIZZJONI

Fluss tal-Arja fil-Kamra

21. Il-fluss tal-arja fil-kamra tal-espożizzjoni għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u rreġistrat mill-anqas kull siegħa matul kull espożizzjoni. Il-monitoraġġ fil-ħin reali tat-konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà temporali) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdi mezzi indiretti għall-kontroll tal-parametri rilevanti u d-dinamiċi kollha tal-inalazzjoni. Jekk il-konċentrazzjoni tkun immonitorjata

▼M4

fil-ħin reali, il-frekwenza tal-kejl tal-flussi tal-arja tista' titnaqqas sa kejl wieħed għal kull espożizzjoni għal kull jum. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex tkun evitata l-inalazzjoni mill-ġdid fil-kmamar għall-imnieħer biss. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u l-konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wieħed jemmen li dan l-istandard ma jkunx jista' jitlaħaq, il-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu u tad-dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu. Jekk il-kejlijiet fl-ewwel jum ta' espożizzjoni juru li dawn il-gassijiet ikunu ta' livelli tajbin, ma jkunux meħtieġa aktar kejlijiet.

Temperatura tal-Kamra u Umdità Relattiva

22. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm f'22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieħer biss, kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata kontinwament u rreġistrata kull siegħa matul kull espożizzjoni meta jkun possibbli. L-umdità relattiva għandha preferibbilment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati taħlitiet abbażi ta' ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minħabba interferenza mill-kimika għall-ittestjar mal-Metodu ta' Ttestjar.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni Nominali

23. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominali tal-kamra ta' espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda hija paragun tal-konċentrazzjoni nominali u l-konċentrazzjoni attwali tagħti indikazzjoni tal-effiċjenza ta' ġenerazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, tista' tintuża biex jinkixfu l-problemi ta' ġenerazzjoni.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni Attwali

24. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar kif ikun itteħdilha l-kampjun tagħha fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu b'metodi speċifiċi (eż. teħid dirett ta' kampjuni, metodi ta' assorbiment jew kimiċi reattivi, u karatterizzazzjoni analitika sussegwenti) jew b'metodi mhux speċifiċi bħal analiżi gravimetrika b'filtru. L-użu ta' analiżi gravimetrika huwa aċċettabbli biss għal aerosols tat-trab b'komponent wieħed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilità baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għall-kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'ħafna komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analiżi gravimetrika. Iżda din teħtieġ dejta analitika li turi li l-kompożizzjoni tal-materjal tal-ajru tkun simili għall-materjal tal-bidu. Jekk din l-informazzjoni ma tkunx disponibbli, tista' tkun meħtieġa analiżi mill-ġdid tal-kimika għall-ittestjar (idealment fl-istat tagħha fl-arja) f'intervalli regolari waqt li jkun għaddej l-istudju. Għal aġenti aerosolizzati li jistgħu jevaporaw jew jissubblimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu nġabru bil-metodu magħżul.

25. Għandu jintuża lott wieħed tal-kimika għall-ittestjar sakemm idum l-istudju, jekk ikun possibbli, u l-kampjun tat-test għandu jinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-purezza, l-omoġeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbeda l-istudju, għandu jkun hemm karatterizzazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkluża l-purezza tagħha, u jekk teknikament fattibbli, l-identità u l-kwantitajiet ta' kontaminanti u impuritajiet identifikati. Dan jista' jintwera iżda ma jkunx limitat mid-dejta li ġejja: ħin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimi oħra. Għalkemm l-identità tal-kampjun tat-test mhix ir-responsabbiltà tal-laboratorju tat-test, jista' jkun prudenti għal-laboratorju tat-test li jikkonferma l-karatterizzazzjoni tal-isponser għall-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

▼M4

26. L-atmosfera ta’ espożizzjoni għandha tinżamm kostanti daqa kemm ikun prattikabbli. Jista’ jintuża apparat ta’ monitoraġġ f’ħin reali, bħalma huwa fotomiter tal-aerosol għal aerosols jew analizzatur tal-idrokarbur totali għall-fwar biex tintwera l-istabbiltà tal-kundizzjonijiet ta’ espożizzjoni. Il-konċentrazzjonijiet attwali tal-kamra għandhom jitkejlu mill-anqas 3 darbiet matul kull jum ta’ espożizzjoni għal kull livell ta’ konċentrazzjoni. Jekk dan ma jkunx jista’ jsir minħabba rati limitati ta’ fluss ta’ arja jew minħabba konċentrazzjonijiet baxxi, ikun aċċettabbli kampjun wieħed għal kull perjodu ta’ espożizzzjoni. Idealment, dan il-kampjun għandu mbagħad jinġabar tul il-perjodu kollu ta’ espożizzzjoni. Il-kampjuni individwali tal-konċentrazzjoni tal-kamra jistgħu jkollhom devjazzjoni mill-konċentrazzjoni medja tal-kamra b’mhux aktar minn ± 10 % għall-gassijiet u l-fwar, u b’mhux aktar minn ± 20 % għall-aerosols likwidi jew solidi. Il-ħin biex tinkiseb ekwilibrazzjoni tal-kamra (t_{95}) għandu jkun ikkalkulat u rrappurtat. Id-durata ta’ espożizzjoni tkopri l-ħin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata. Din tqis il-ħinijiet meħtieġa biex jinkisbu l-ekwilibrazzjoni (t_{95}) u d-degradazzjoni tal-kamra. Il-gGwida għal stima ta’ t_{95} tinsab f’GD 39 (2).

27. Għal taħlitiet kumplessi ħafna li jikkonsistu f’gassijiet/fwar u aerosols (eż. atmosferi ta’ kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodotti/mezzi ta’ użu finali b’għan speċifiku), kull fażi tista’ taġixxi b’mod differenti f’kamra tal-inalazzjoni. Għalhekk, għandha tintgħażel mill-anqas sustanza indikatriċi waħda (analita), normalment is-sustanza attiva prinċipali fit-taħlita, ta’ kull fażi (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun taħlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-taħlita totali, u mhux biss għall-ingredjent attiv jew għas-sustanza indikatriċi (analita). L-informazzjoni addizzjonali dwar konċentrazzjonijiet attwali tinsab f’GD 39 (2).

Kimika għall-Ittestjar: Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Partiċelli

28. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas kull ġimgħa għal kull livell ta’ konċentrazzjoni billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv, bħall-għodda ajrudinamika li tagħti d-daqs lill-partiċelli (APS). Jekk tkun tista’ tinkiseb ekwivalenza tar-riżultati miksubin minn impattur kaskata u mill-istrument alternattiv, f’dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista’ jintuża tul l-istudju kollu.

29. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża b’mod parallell mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-ġabra. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b’analiżi tad-daqs tal-partiċelli għandha tkun fil-limiti raġonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b’analiżi b’filtru [ara GD 39 (2)]. Jekk tkun tista’ tintwera ekwivalenza fil-konċentrazzjonijiet kollha ttestjati fil-fażi bikrija tal-istudju, f’dak il-każ kejlijiet ta’ konferma ulterjuri jistgħu jitħallew barra. Biex jinżamm trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista’ twassal għal ħtieġa ta’ ripetizzjoni tal-istudju.

30. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista’ tirriżulta kondensazzjoni ta’ fwar fil-formazzjoni ta’ aerosol, jew jekk jinstabu partiċelli f’atmosfera ta’ fwar b’potenzjal għall-fażijiet imħallta.

OSSERVAZZJONIJIET

31. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament qabel, matul u wara l-perjodu ta’ espożizzzjoni. Jistgħu jkunu indikati osservazzjonijet aktar ta’ spiss skont ir-rispons tal-annimali matul l-espożizzjoni. Meta l-osservazzjoni tal-annimali tkun imfixkla bl-użu ta’ tubi ta’ trażżin tal-annimali, bi kmamar għall-ġisem kollu mixgħulin ħażin, jew b’atmosferi opaki, l-annimali għandhom ikunu osservati bir-reqqa wara l-espożizzjoni. L-osservazzjonijiet qabel l-espożizzjoni tal-jum li jkun imiss jistgħu jivvalutaw kwalunkwe riversibbiltà jew effetti tossiċi li jkunu marru aktar għall-agħar.

▼M4

32. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'reġistri individwali miżmumin għal kull annimal. Meta l-annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.

33. L-osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn, u l-membrani mukużi; il-bidliet fis-sistema respiratorja u ċirkulatorja, il-bidliet fis-sistema nervuża, u l-bidliet fl-attività somatomotorja u fix-xejriet tal-imġiba. Attenzjoni għandha tkun diretta għall-osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulżjonijiet, tbeżliq, dijarea, letarġija, rqad u koma. Il-kejl tat-temparaturi tar-rektum jista' jipprovdi evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ipo/ipertermja relatati mat-trattament jew l-għeluq. Jistgħu jkunu inklużi valutazzjonijiet addizzjonali fil-protokoll ta' studju bħal kinetika, monitoraġġ bijoloġiku, funzjoni tal-pulmun, ritenzjoni ta' materjali li ftit jinħallu li jinġemgħu fit-tessut tal-pulmun, u bidliet fl-imġiba.

PIŻIJIET TAL-ĠISEM

34. Il-piżijiet tal-annimali indivdwali għandhom jiġu rreġistrati ftit qabel l-ewwel espożizzjoni (jum)), u darbtejn fil-ġimgħa wara din (pereżempju: nhar ta' Ġimgħa u nhar ta' Tnejn biex juru l-irkupru matul tmiem il-ġimgħa mingħajr espożizzjoni jew matul intervall tal-ħin biex jippermetti valuazzjoni tat-tossiċità sistematika) jew fil-mument tal-mewt jew l-ewtanażja. Jekk ma jkunx hemm effetti fl-ewwel ġimagħtejn (2), il-piżijiet tal-ġisem jistgħu jitkejlu kull ġimgħa għall-bqija tal-istudju. L-annimali satellitarji (riversibbli) (jekk użati) għandhom jibqgħu jintiżnu kull ġimgħa tul il-perjodu kollu ta' rkupru. Fi tmiem l-istudju, l-annimali kollha għandhom jintiżnu ftit qabel il-qatla biex titħalla ssir kalkulazzjoni imparzjali tal-proporzjonijiet tal-organi mal-piżijiet tal-ġisem.

KONSUM TAL-IKEL U L-ILMA

35. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel kull ġimgħa. Il-konsum tal-ilma wkoll jista' jitkejjel.

PATOLOĠIJA KLINIKA

36. Il-valutazzjonijiet tal-patoloġija klinika għandhom isiru għall-annimali kollha, inklużi annimali ta' kontroll u satellitarji (riversibbli), meta jinqatlu. L-intervall ta' ħin bejn tmiem l-espożizzjoni u l-ġbir tad-demm għandu jiġi rreġistrat, l-aktar meta l-kostituzzjoni mill-ġdid tal-punt ta' tmiem indirizzat tkun mgħaġġla. It-teħid ta' kampjuni wara tmiem espożizzjoni huwa indikat għal dawk il-parametri b'nofs ħajja plażmatika qasira (eż. COHb, CHE, and MetHb).

37. It-Tabella 1 telenka l-parametri ta' patoloġija klinika li ġeneralment ikunu meħtieġa għall-istudji tossikoloġiċi kollha. L-analiżi tal-awrina ma tkunx meħtieġa abbażi ta' rutina, iżda tista' ssir meta titqies utli bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jivvaluta parametri addizzjonali biex jikkaratterizza aħjar it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar (eż. kolinesteraži, lipidi, ormoni, bilanċ ta' aċidu/baži, metemoglobina jew korpi ta' Heinz, kinaži tal-kreatina, proporzjon ta' mjelojde/eritrojde, troponini, gassijiet ta' demm arterjali, deidroġenaži lattat, deidroġenaži tas-sorbitol, glutamat ta' deidroġenaži u gamma glutamil transpeptidaži).

▼M4

Tabella 1

Parametri Standard ta' Patoloġija Klinika

Ematoloġija	
Għadd ta' eritroċiti	Għadd totali ta' lewkoċiti
Ematokrit	Għadd differenzjali ta' lewkoċiti
Konċentrazzjoni ta' emoglobina	Għadd ta' pjastrini
Emoglobina korpuskulari medja	Potenzjal għal emboliżmu (agħżel wieħed):
Volum korpuskulari medju	— Ħin protrombin
Konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja	— Ħin ta' emboliżmu
Retikuloċiti	— Ħin tromboplastin parzjali
Kimika klinika	
Glukożju (*)	Aminotransferaži tal-alanina
Kolesterol totali	Aspartate aminotransferaži
Trigliċeridi	Fosfataži alkalina
Nitroġenu tal-urea tad-demm	Potassju
Bilirubina totali	Sodju
Kreatinina	Kalċju
Proteina totali	Fosforu
Albumina	Klorur
Globulina	
Analiżi tal-awrina (fakultattiva)	
Dehra (lewn u turbidità)	Proteina totali
Volum	Glukożju
Gravità speċifika jew ożmolalità	Demm/ċelluli tad-demm
pH	

(*) Minħabba li perjodu ta' sawm fit-tul jista' jintroduċi parzjalità fil-kejl tal-glukożju għall-annimali ttrattati ma' dawk tal-kontroll, id-direttur tal-istudju għandu jiddetermina jekk ikunx sewwa li jsajjem lill-annimali. Jekk jintuża perjodu ta' sawm, dan għandu jkun adattat għall-ispeċi użata; għall-far dan jista' jkun 16-il siegħa (sawm tul il-lejl). Determinazzjoni ta' glukożju għas-sawm tista' ssir wara sawm tul il-lejl matul l-aħħar ġimgħa ta' espożizzjoni, jew wara sawm tul il-lejl qabel awtopsja (f'dan l-aħħar każ flimkien mal-parametri patoloġiċi kliniċi l-oħra kollha).

38. Meta jkun hemm evidenza li s-sistema respiratorja inferjuri (jiġifieri, l-alveoli) tkun is-sit primarju ta' depożizzjoni u ritenzjoni, f'dak il-każ il-ħasil tal-bronkoalveolari (BAL) jista' jkun it-teknika ta' għażla biex ikunu analizzati kwantitattivament parametri b'effett ta' doża abbażi ta' ipoteżi li jiffokaw fuq l-alveolitis, l-infjammazzjoni pulmonari, u l-fosfolipidoży. Dan jippermetti li jkunu investigati sewwa bidliet ta' doża-rispons u ta' perkors ta' żmien meta jkun hemm ħsara alveolari. Il-fluwidu BAL jista' jkun analizzat għal għedud totali u differenzjali ta' lewkoċiti, proteina totali u deidroġenaži lattat. Parametri oħra li jistgħu jitqiesu huma dawk li jindikaw ħsara liżosomali, fosfolipidoży, fibroži u infjammazzjoni irritanti jew allerġika li tista' tinkludi d-determinazzjoni ta' ċitokines/kejmokines proinfjammatorji. Il-kejlijiet BAL ġeneralment jikkumplimentaw ir-riżultati minn eżamijiet ta' istopatoloġija iżda ma jistgħux jeħdulhom posthom. Gwida dwar kif isir il-ħasil tal-pulmuni tinsab f'GD 39 (2).

▼**M4**

PATOLOĠIJA MAKROSKOPIKA U PIŻIJIET TAL-ORGANI

39. L-annimali kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jitneħħew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal żvinar sħiħ (jekk ikun jista' jsir) u għal awtopsja makroskopika. Il-ħin bejn it-tmiem tal-aħħar espożizzjoni ta' kull annimal u meta jinqatel għandu jiġi rreġistrat. Jekk ma tkunx tista' ssir awtopsja minnufih wara li jkun instab annimal mejjet, l-annimal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperatura baxxa biżżejjed biex tkun imminimizzata awtoliżi. Awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopiċi kollha għandhom jiġi rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.

40. It-Tabella 2 telenka l-organi u t-tessuti li għandhom ikunu ppreservati f'midjum adattat matul awtopsja makroskopika għal eżami istopatoloġiku. Il-preservazzjoni tal-organi u tat-tessuti [mqegħdin flimkien] u ta' kull organu u tessut ieħor tkun fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. L-organi mitkubin b'**tipa grassa** għandhom jintraqmu u jintiżnu mxarbin malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni biex ikun evitat it-tnixxif. It-tirojde u l-epididimi għandhom jintiżnu biss jekk ikun meħtieġ minħabba li ċ-ċelloli mill-irqim jistgħu jfixklu l-evalwazzjoni istopatoloġika. It-tessuti u l-organi għandhom jitqiegħdu f'10 % ta' formalina newtralizzata jew f'fissattiv adattat ieħor malli ssir l-awtopsja, u mhux f'anqas minn 24-48 siegħa qabel l-irqim skont il-fissattiv li għandu jintuża.

Tabella 2

Organi u Tessuti Ippreservati Matul Awtopsja Makroskopika

Adrenali	Bżieżaq seminali
Mudullun tal-għadam (u/jew aspirat frisk)	Nerv vertebrali (ċervikali, midtoraċiku u lumbari)
Moħħ (inklużi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/meżoċefalu)	**Milsa**
[Għajnejn (retina, nerv ottiku) u tebqiet l-għajnejn]	Stonku
Qalb	**Testikoli**
Kliewi	**Timu**
Larinġi (3 livelli, 1 livell biex jinkludi l-bażi tal-epiglotta)	Tirojde
Fwied	Trakea (mill-anqas 2 livelli inkluża 1 taqsima lonġitudinali tul il-karina u 1 taqsima trasversali)
Pulmun (id-denduliet kollha f'livell wieħed, inklużi l-bronki ewlenin)	[Bużżieqa tal-awrina]
Nodi limfatiċi mir-reġjun ilarju tal-pulmun, speċjalment għal kimiċi f'partiċelli għall-ittestjar li ftit jinħallu. Għal eżamijiet u/jew studji aktar fil-fond b'fokus immunoloġiku, jistgħu jitqiesu nodi limfatiċi addizzjonali, eż. dawk mir-reġjuni medjastinali, ċervikali/-submandibulari u/jew awrikulari.	Utru
	Il-leżjonijiet kbar kollha
It-tessuti nażofaringali (mill-anqas 4 livelli; 1 livell biex jinkludi l-kanal nażofaringali u t-Tessut Limfojde b'Assoċjazzjoni Nażali (NALT)	
Esofagu	
[Basla tax-xamm]	
Ovarji	

▼M4

41. Il-pulmuni għandhom jitneħħew intatti, jintiżnu u jiddaħħlu b'fissattivi adatti bi pressjoni ta' 20-30 cm ta' ilma biex ikun żgurat li tinżamm l-istruttura tagħhom (5). Għandhom jinġabru taqsimiet għad-denduliet kollha f'livell wieħed, inklużi l-bronki ewlenin, iżda jekk isir il-ħasil tal-pulmuni, id-dendula mhux maħsula għandha titqiegħed fit-taqsima bi tliet livelli (mhux taqsimiet tas-serje).

42. Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas 4 livelli tat-tessuti nażofariġali, li wieħed minnhom għandu jinkludi l-kanal nażofariġali, (5, 6, 7, 8, 9) biex jitħalla jsir eżami adegwat tal-epitelju mimli qxur, tranżizzjonali (respiratorju mhux vibrali), respiratorju (respiratorju vibrali) u tax-xamm, u tat-tessut limfatiku tat-tisfija (NALT; 10, 11). Għandhom ikunu eżaminati tliet livelli tal-lariġi, u wieħed minn dawn il-livelli għandu jinkludi l-bażi tal-epiglotta (12). Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas żewġ livelli tat-trakea, inkluża taqsima waħda longitudinali tul il-karina minn fejn il-bronki estrapulmonari jinqasmu fi tnejn u taqsima waħda trasversali.

ISTOPATOLOĠIJA

43. Evalwazzjoni istopatoloġika tal-organi u tat-tessuti kollha elenkati fit-Tabella 2 għandha ssir għall-gruppi ta' kontroll u ta' konċentrazzjoni għolja, u għall-annimali kollha li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lis-sistema respiratorja, organi mmirati u leżjonijiet kbar. L-organi u t-tessuti li jkollhom leżjonijiet fil-grupp ta' konċentrazzjoni għolja għandhom ikunu eżaminati fil-gruppi kollha. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jagħmel evalwazzjonijiet istopatoliġiċi għal gruppi addizzjonali biex juri rispons ċar ta' konċentrazzjoni. Meta jintuża grupp satellitarju (riversibbli), għandha ssir evalwazzjoni istopatoloġika għat-tessuti u l-organi kollha identifikati bħala li jkunu juru effetti fil-gruppi ttrattati. Jekk ikun hemm għadd eċċessiv ta' mwiet bikrija jew problemi oħra fil-grupp ta' espożizzjoni għolja li jippreġudikaw is-sinifikat tad-dejta, il-konċentrazzjoni aktar baxxa li jkun imiss għandha tkun eżaminata istopatoloġikament. Għandu jsir sforz biex osservazzjonijiet gravi jitqabblu ma' sejbiet mikroskopiċi.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

44. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwali dwar il-piżijiet tal-ġisem, il-konsum ta' ikel, il-patoloġija klinika, il-patoloġija makroskopika, il-piżijiet ta' organi u l-istopatoloġija. Dejta dwar osservazzjonijiet kliniċi għandha tingħabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali użati, l-għadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali speċifiċi ta' tossiċità, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-ħin tal-mewt ta' kull annimal, deskrizzjoni u perkors ta' żmien ta' effetti tossiċi u riversibbiltà, u sejbiet minn awtopsji. Ir-riżultati kollha, kwantitattivi u inċidentali, għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika adattat. Jista' jintuża kull metodu ta' statistika ġeneralment aċċettat u l-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju.

Rapport tat-Test

45. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, kif jixraq:

Annimali tat-test u trobbija

— Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta.

▼M4

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far; Jistgħu jkunu pprovduti sors u dejta storika, jekk ikunu minn annimali esposti f'kundizzjonijiet simili ta' espożizzjoni, abitazzjoni u sawm.

— Għadd, età u sess tal-annimali.

— Metodu ta' każwalità.

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard.

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza, u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża isomerizzazzjoni).

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS), jekk ikunu magħrufa;

Vejjikolu

— Ġustifikazzjoni għal użu ta' vejjikolu u ġustifikazzjoni għal għażla tal-vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

— Dejta storika jew konkurrenti li turi li l-vejjikolu ma jfixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni dettaljata tal-kamra tal-inalazzjoni inkluż volum u dijagramma.

— Sors u deskrizzjoni ta' tagħmir użat għall-espożizzjoni tal-annimali, kif ukoll ġenerazzjoni tal-atmosfera.

— Tagħmir għall-kejl tat-temperatura, umdità, daqs ta' partiċelli u konċentrazzjoni attwali;

— Sors ta' arja u sistema użata għal kondizzjonament.

— Metodi użati għall-kalibrazzjoni ta' tagħmir biex tkun żgurata atmosfera omoġenea tat-test.

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva).

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieħer biss); tqegħid tal-annimali fil-kamra (ġisem kollu).

— Stabbiltà tal-atmosfera tat-test.

— Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u teħid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;

— Trattament ta' arja pprovduta/estratta.

— Rati ta' fluss tal-arja, rata ta' fluss ta' arja/port ta' espożizzjoni (mnieħer biss), jew toqol tal-annimali/kamra (ġisem kollu).

— Ħin għall-ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t95).

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli).

Dejta ta' espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni.

▼M4

— Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal ġol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra).

— Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-żona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal taħlitiet li jipproduċu forom fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament.

— Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (mg/l mg/m^3, eċċ.) milli f'unitajiet ta' volum (ppm, ppb, eċċ.).

— Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli, dijametru ajrudinamiku ta' medjan tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Għandha tkun irrappurtata analiżi individwali ta' kull daqs ta' partiċella.

Kundizzjonijiet tat-test

— Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kull proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli ta' solidi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar.

— Deskrizzjoni (preferibbilment inkluża dijagramma) tat-tagħmir użat biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test u biex l-annimali jkunu esposti għall-atmosfera tat-test.

— Dettalji tat-tagħmir użat biex jimmonitorja t-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss ta' arja fil-kamra (jiġifieri żvilupp ta' kurva ta' kalibrazzjoni).

— Dettalji tat-tagħmir użat biex jinġabru kampjuni għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-kamra u d-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli.

— Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u tal-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-teħid tal-kampjuni);

— Metodu ta' każwalità fl-assenjazzjoni ta' annimali lil gruppi ta' ttestjar u ta' kontroll.

— Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inklużi tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma).

— Il-motiv għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test.

Riżultati

— Tabulazzjoni tat-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss tal-arja.

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' konċentrazzjoni nominali u attwali tal-kamra.

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar id-daqs tal-partiċelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli u kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g.

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar rispons u ta' livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri, annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, iż-żmien meta jfaqqgħu u durata tal-effetti).

▼M4

— Tabulazzjoni tal-piżijiet individwali ta' kull annimal.

— Tabulazzjoni tal-konsum tal-ikel

— Tabulazzjoni ta' dejta ta' patoloġija klinika

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli.

— Tabulazzjoni ta' kull parametru ieħor imkejjel

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfażi partikolari għad-deskrizzjoni tal-metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-konċentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-partiċelli.

— Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni fil-partiċelli, meqjusin is-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-partiċelli ma setgħux jitħarsu;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probbbali tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati.

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm ħtieġa li b'mod uman jinqatlu annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).

— L-organu/i mmirat(i) għandu/hom jiġi/u identifikat/i.

— NOAEL u LOAEL għandhom ikunu ddeterminati.

LETTERATURA:

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP u Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-Ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼B

B.9. **DOŻI REPETUTI (28 JUM) TOSSIĊITÀ (DERMALI)**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (A).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (B).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. PRINCIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test hija somministrata b'mod orali, ta' kuljum, b'doży meqjusa lil diversi gruppi ta' annimali sperimentali, b'doża waħda tkun użata ma kull grupp matul perjodu ta' 28 jum. Matul il-perjodu ta' l-amministrazzjoni, l-annimali huma osservati ta' kuljum sabiex ikunu skoperti sinjali tat-tossiċità. Annimali li jmutu matul it-test ikollhom awtopsija tal-mewt u l-konklużjoni tat-test li l-annimali li jibqgħu ħajjin ikollhom ukoll l-awtopsija ta' wara l-mewt.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Preparazzjonijiet**

L-annimali huma miżmuma f'fondi sperimentali u f'kundizzjonijiet tal-għalf għal mill-anqas ħamest ijiem. Qabel it-test, annimali adulti żgħażagħ b'saħħithom huma magħżula b'mod kif jinzerta u assenjati lejn gruppi għat-trattament. Xi ftit qabel it-testijiet, il-pil huwa maqtugħ miż-żona dorsali tad-dahar ta' l-annimali tat-test. It-tqaxxir jista' jkun użat imma għandu jkun imwettaq madwar 24 siegħa qabel it-test. Ir-repetizzjoni tal-qtugħ jew tat-tqaxxir normalment ikun meħtieġ f'intervalli ta' madwar darba fil-ġimgħa. Meta jsir il-qtugħ jew it-tqaxxir tal-pil, kura għandha tittieħed sabiex ikun evitat xi grif fil-ġilda li jkunu jistgħu jibdlu l-permeabbiltà tagħha. Mhux anqas minn 10 % tal-wiċċ tal-ġisem għandu jkun imnaddaf għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-piż ta' l-annimali għandu jkun meqjus meta tkun deċiża ż-żona li għandha tkun imnaddfa u l-qisien kollha tal-koperta. Meta jsiru testijiet tas-solidi, li jistgħu ikunu pulverizzati jekk xieraq, is-sustanza tat-test għandha tkun b'umiditàsuffiċjenti bl-ilma, jew, meta meħtieġ, apparat adattat sabiex jassigura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Sustanzi likwidi tat-test huma ġeneralment użati mingħajr ma jkunu mrattba. Applikazzjoni odjerna bħala bażi ta' minn ħamsa sa sebat ijiem fil-ġimgħa hija użata.

1.6.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.6.2.1. *Annimali sperimentali*

Firien jew fniek, jew fniek ta' l-indi adulti jistgħu ikunu użati. Speċje oħrajn jistgħu ikunu użati imma l-użu tagħhom ikun jeħtieġ ġustifikazzjoni.

▼B

Fil-bidu ta' kull test, il-medda tal-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi ± 20 % tal-valur medju kif xieraq.

1.6.2.2. *Numru u sess.*

Mill-anqas 10 annimali gerriema (ħamsa femminili u ħamsa maskili) għandhom ikunu użati f'kull livell ta' doża. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma weldu u li ma humiex tqal. Jekk sagrifikar interim huwa ippjanat, in-numru ta' l-annimali għandu jkun miżjud bin-numru ta' l-annimali skedati li jkunu sagrifikati qabel it-tkomplija ta' l-istudju. B'żieda, grupp satellita ta' 10 annimali (ħames annimali kull sess) jistgħu ikunu ittrattati b'doża ta' livell għoli għal 28 jum u osservati għar-riversabbiltà, persistenza, jew għal okkurrenza mdewma ta' l-effetti tossiċi għal 14-il jum ta' wara t-trattament. Grupp satellita ta' 10 annimali ta' kontroll (ħames annimali kull sess) huwa wkoll użat.

1.6.2.3. *Livell tad-doża*

Mill-anqas tlett livelli ta' dożi huma meħtieġa bil-kontroll u mezz ta' kontroll, jekk mezz ikun użat. Il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkun ta' mill-anqas ta' sitt siegħat kuljum. Għal sustanzi amministrati bi tmiegħ sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija f'ħinijiet simili f'kull jum u l-livelli tad-doża għandhom ikunu aġġustati matul l-intervalli (ta' kull ġimgħa jew ta' darbtejn fil-gimgħa) sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż ta' l-annimal. Apparti milli t-trattament tas-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ikunu trattati b'mod identiku bħal dawk suġġetti għat-test. Meta mezz ikun użat sabiex jiffaċilita l-għoti tad-doża, l-kontrolli għandhom ikollhom doża bil-mezz bl-istess mod bħal gruppi ittrattati, u jirċievu l-istess ammont ta' mezz bħal dak li jkunu irċevew il-grupp bil-livell ta' l-ogħla doża. Il-livell ta' l-ogħla doża għandu jirriżulta f'effetti tossiċi imma ma jipproduċi l-ebda, jew ftit, imwiet. Il-livell tad-doża l-aktar baxxa m'għandux jipproduċi xi evidenza ta' tossiċità. Meta jkun hemm estimi użabbli ta' l-espożizzjoni umana, il-livell l-aktar baxx għandu jeċċedi dan. Idealment, il-livell medju tad-doża għandu jipproduċi effetti tossiċi minimi osservabbli. Jekk aktar minn doża intermedja waħda tkun użata, l-livelli tad-doża għandhom ikunu spazzjati bi gradjazzjoni ta' l-effetti tossiċi. Fil-gruppi baxxi jew intermedji u f'dawk tal-kontroll, l-inċidenza ta' xi fatalitajiet għandha tkun baxxa sabiex tippermetti ewalwazzjoni sensibbli tar-riżultati.

Jekk l-applikazzjoni tas-sustanzi tat-test tipproduċi irritazzjoni severa tal-ġilda, l-konċentrazzjonijiet għandhom ikunu mnaqqsa u dan jista' jirriżulta fi tnaqqis fil, jew fl-assenza ta', l-effetti tossiċi l-oħrajn, fil-livell għoli tad-doża. Aktar minn hekk, jekk il-ġilda tkon sofriet ħsara qawwija, jista' jkun meġtieġ li jkun imwaqqaf l-istudju u li jinbeda studju ġdid b'konċentrazzjoni aktar baxxa.

1.6.2.4. *Test ta' limitazzjoni*

Jekk studju preliminari fil-livell ta' doża ta' 1 000 mg/kg, jew livell ta' doża ogħla relattat ma l-espożizzjoni umana possibbli meta dan ikunu magħruf, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi, aktar testijiet ma jkunu aktar meqjusa bħala meħtieġa.

1.6.2.5. *Perijodu ta' l-Osservazzjoni*

L-annimali sperimentali għandhom ikunu osservati ta' kuljum għal sinjali tat-tossiċità. Il-ħin tal-mewt u ż-żmien li fih tidher jew tisparixxi t-tossiċità għandhom ukoll ikunu irreġistrati.

▼B

1.6.3. **Il-proċedura**

L-annimali għandhom jinżammu f'gaġġeġ individwali. L-annimali jirċievu d-doża bis-sustanza tat-test idealment fis-sebat ijiem tal-ġimgħa għal perjodu ta' 28 jum. L-annimali f'xi grupp satellita skedat għall-osservazzjoni b'segwiment għandhom jinżammu għal 14-il jum ieħor mingħajr trattament sabiex tkun żvelata xi irkupru minn, jew il-persistenza ta', l-effetti tossiċi. Il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkun ta' mill-anqas ta' sitt sieġħat kuljum.

Is-sustanza tat-test għandha tkun applikata b'mod uniformi fuq żona li hija madwar 10 % taż-żona totali tal-wiċċ tal-ġisem. B'sustanzi ferm tossiċi, iż-żona tal-wiċċ koperta tista' tkun anqas imma kemm jista' jkun miż-żona għandha tkun koperta b'saff irqieq u uniformi kemm jista' jkun possibbli.

Matul l-espożizzjoni s-sustanza tat-test tinżamm f'kuntatt mal-ġilda b'garża poruża u faxxa mhux irritanti. Is-sit tat-test għandu jkun aktar kopert b'mod xieraq sabiex iżomm il-faxxex bil-garża u s-sustanza tat-test u jassiguraw li l-annimali ma jkunux jistgħu jilgħaqu u jieklu s-sustanza tat-test. Restrizzjonijiet jistgħu jintużaw sabiex jipprevjenu l-inġestjoni tas-sustanza tat-test, imma immobilizzazzjoni kompleta mhix metodu rakkommandat. Bħala alternattiva, "apparat b'għonq protettiv" jista' jkun użat.

Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, ir-residwu tas-sustanza tat-test għandu jkun imneħħi, meta prattikabbli, bl-użu ta' ilma jew xi metodu xieraq ieħor tat-tindif tal-ġilda.

L-annimali kollha għandhom ikunu osservati ta' kuljum u s-sinjali tossiċi irreġistrati jkunu inklużi, meta jsir it-tfaqqiegħ, il-grad u t-tul ta' żmien tagħhom. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-ġilda u l-pil, fl-għajnejn u membrani mukożji, u anki fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċi u tas-sistema ċentrali tan-nervituri; l-attività somatomotori u l-istil ta' l-imġieba. Il-kejl għandu jsir ta' kull ġimgħa dwar il-piż ta' l-annimali. Huwa wkoll rakkommandat li l-konsum ta' l-ikel ikun imkejjel ta' kull ġimgħa. Osservazzjonijiet regolari ta' l-annimali huma meħtieġa sabiex jassiguraw li l-annimali jkunu, sakemm ikun possibbli, mhux mitlufa mill-istudju minħabba kawżi oħrajn bħalma huma kannibaliżmu, awtolożi tan-nisġa jew mitlufa. Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-istudju, dawk kollha li jkunu għadhom ħajjin fil-gruppi tat-trattament mhux-satellita, jkunu maqtula u awtopsija tkun imwettqa immedjatament. Annimali moribondi u annimali f'uġieġħ jew strapazz sever għandhom ikunu mneħħija meta dan ikun innutat, u maqtula sabiex tkun evitata l-moħqrija u titwettaq awtopsja ta' wara l-mewt.

L-eżami li ġejja għandha sseħħ fit-tmiem tal-perjodu tat-test għall-annimali kollha, inklużi dawk tal-kontrolli:

1) ħematoloġija, inkluża mill-anqas il-ħematokrità, l-konċentrazzjoni tal-ħemaglobulini, l-għadd ta' l-eritroċiti, l-għadd totali u differenzali tal-lewtoċiti, u l-kejl tal-potenzal ta' boċċi fid-demm;

2) biokemistrija klinika tad-demm, inkluż mill-anqas parametru wieħed tal-fwied u tal-funzjoni tal-kliewi: aminotransferaži ta' l-alanina tas-serum (qabel kienet magħrufa bħala t-transaminaži piruvika glutamika), il-aminotransferaži aspartata tas-serum (qabel kienet magħrufa bħala t-transaminaži ossalo-aċetika glutamika), in-nitroġenu ta' l-urea, l-albumina, il-kreatinin tad-demm, il-bilirubin totali u l-protein totali tas-serun.

Determinazzjonijiet oħrajn li jistgħu jkunu meħtieġa għal evalwazzjoni tossikologika adekwata, inkluż il-kalċju, l-fosfru, l-klorid, is-sodju, il-putassa, l-glokożju tas-sawm, l-analiżi tal-lipidi, l-ormoni, l-bilanċ tal-aċidu/baži, l-metaemoglobina, l-attività kolinesteraži.

▼B

Biokemistrija klinika addizzjonali tista' tkun użata, meta meħtieġ, sabiex tkun estiża l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati.

1.6.4. **Nekopsija Grossa (awtopsija ta' wara l-mewt)**

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu suġġetti għall-awtopsja sħiħa grossa ta' wara l-mewt. Mill-anqas il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, u t-testi għandhom ikunu miżuna niedja malajr kemm jista' jkun poissibbli wara d-dissikazzjoni sabiex ikun evitat li jinxfu. Organi u ċerti nsiġ tal-ġisem (fwied, kliewi, il-milsa (l-marrara), it-testi, l-adrenali, l-qalb, u xi organi oħrajn li juru feriti kbar jew tibdil fid-daqs) għandhom ikunu ippreservati f'medja xierqa għall-possibbiltà ta' eżami futura ħistopatoloġika.

1.6.5. **Eżaminazzjoni ħistopatoloġika**

Fil-grupp ta' doża għolja u fil-grupp ta' kontroll, l-eżaminazzjoni ħistoloġika għandha tkun imwettqa fuq l-organi u l-insiġ ippreservati. Organi u nsiġ li juru difetti attribwibbli għas-sustanza tat-test fil-livell ta' l-ogħla doża għandhom ikunu eżaminati fil-gruppi kollha tad-doża l-baxxa. L-annimali f'xi grupp satellita għandhom ikunu eżaminati ħistoloġikalment b'enfasi partikolari fuq l-organi u nsiġ identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi l-oħrajn ittrattati.

2. **DATA**

Id-data għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test u n-numru ta' l-annimali li jiżvelaw kull tip ta' ferita.

Ir-riżultati osservati kollha għabdhom ikunu evalwati b'metodu statistiku xieraq. Kwalunkwe metodu statistikali rikonoxxut jista' jkun użat.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— id-dettalji dwar l-annimal (l-ispeċje, silta, sorsi, il-kundizzjonijiet ambjentali, dieta, eċċ.);

— kundizzjonijiet tat-test (inklużu t-tip ta' faxex: okklussivi jew mhux okklussivi);

— il-livelli tad-doża (inkluż il-mess, jekk użat), u l-konċentrazzjonijiet;

— il-livell ta' l-ebda effett, meta possibbli;

— dettalji dwar ir-reazzjoni tossika bis-sess u d-doża;

— il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqgħu ħajjin fit-terminazzjoni tat-test;

— l-effetti tossiċi jew oħrajn;

— il-ħin ta' l-osservazzjoni u kull sinjal annormali u l-korsa sussegwenti tiegħu;

— dettalji dwar l-ikel u piż tal-ġisem;

— testijiet ħematoloġiċi użati u r-riżultati kollha;

▼B

— testijiet ħematoloġiċi kliniċi użati u r-riżultati kollha;

— is-sejbiet ta' l-awtopsja ta' wara l-mewt;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet ħistopatoloġiċi kollha;

— trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq;

— diskussjoni tar-riżultati;

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (D).

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (E).

▼M7

B.10. TEST *IN VITRO* TA' ABERRAZZJONI KROMOŻOMIKA FIL-MAMMIFERI

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 473 (2016) tal-OECD Huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Ġie żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (1).

L-iskop tat-test *in vitro* ta' aberrazzjoni kromożomika huwa li jidentifika s-sustanzi kimiċi li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali f'kulturi ta' ċelloli tal-mammiferi (2) (3) (4). L-aberrazzjonijiet strutturali jistgħu jkunu ta' żewġ tipi, kromożomiċi jew kromatidi. Tista' sseħħ piploplojdija (inkluża endoreduplikazzjoni) f'assaġġi tal-aberrazzjoni kromożomika *in vitro*. Filwaqt li l-anewġeni jistgħu jinduċu l-poliplojdija, il-poliplojdija waħedha ma tindikax potenzjal anewġeniku u tista' tindika sempliċi perturbazzjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli jew ċitotossiċità (5). It-test mhuwiex imfassal sabiex ikejjel l-anewplojdija. Sabiex jiġi verifikat hemmx anewplojdija, ikun rakkomandat test *in vitro* tal-mikronukleu (6).

It-test *in vitro* ta' aberrazzjoni kromożomika jista' juża kulturi ta' linji ta' ċelloli stabbiliti jew kulturi ta' ċelloli primarji ta' oriġini mill-bniedem jew minn rodituri. Iċ-ċelloli użati għandhom jintgħażlu fuq il-bażi tal-abilità ta' tkabbir fil-kultura, l-istabilità tal-karjotip (inkluż in-numru ta' kromożomi) u l-frekwenza spontanja tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi (7). Bħalissa, id-dejta disponibbli ma tippermettix li jinħarġu rakkomandazzjonijiet assoluti iżda tissuġġerixxi li, meta jiġu evalwati l-perikli kimiċi, huwa importanti li jiġu kkunsidrati l-istatus *p53*, l-istabilità ġenetika (karjotip), il-kapaċità ta' tiswija tad-DNA u l-oriġini (minn rodituri jew mill-bniedem) taċ-ċelloli magħżulin għall-ittestjar. Għalhekk, dawk li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar huma mħeġġin jikkunsidraw l-influwenza ta' dawn il-karatteristiċi u karatteristiċi oħrajn taċ-ċelloli fuq il-prestazzjoni ta' linja ta' ċelloli fis-sejbien tal-induzzjoni ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi, peress li l-għarfien dejjem qiegħed jiżdied f'dan il-qasam.

Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

It-testijiet li jsiru *in vitro* ġeneralment jirrekjedu l-użu ta' sors eżoġeniku ta' attivazzjoni metabolika sakemm iċ-ċelloli ma jkunux metabolikament kompetenti fir-rigward tas-sustanzi kimiċi tat-test. Is-sistema eżoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*. Wieħed għandu joqgħod attent li jevita kundizzjonijiet li jistgħu jwasslu għal riżultati pożittivi artifiċjali, jiġifieri ħsara fil-kromożomi mhux ikkaġunata minn interazzjoni diretta bejn is-sustanzi kimiċi tat-test u l-kromożomi; tali kundizzjonijiet jinkludu bidliet fil-pH jew l-ożmolalità (8) (9) (10), interazzjoni ma' komponenti medji (11) (12) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossiċità (13) (14) (15) (16).

Dan it-test jintuża sabiex jaqbad aberrazzjonijiet kromożomiċi li jistgħu jirriżultaw minn avvenimenti klastoġeniċi. L-analiżi ta' induzzjoni ta' aberrazzjoni kromożomika għandha ssir bl-użu ta' ċelloli fil-metafaża. Għalhekk, huwa essenzjali li ċ-ċelloli għandhom jiksbu l-mitożi kemm f'kulturi ttrattati kif ukoll f'dawk mhux ittrattati. Għal nanomaterjali manifatturati, jaf ikun hemm bżonn li jsiru adattamenti speċifiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar li ma jkunux deskritti fih.

Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

▼M7

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-kulturi ta' ċelloli ta' oriġini umana jew minn mammiferi oħrajn huma esposti għas-sustanza kimika tat-test kemm b'sors eżoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr dan is-sors sakemm ma jintużawx ċelloli b'kapaċità metabolizzanti adegwata (ara l-paragrafu 13). F'intervalli prestabbiliti kif xieraq wara li l-kulturi ta' ċelloli jibdew jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test, dawn jiġu ttrattati b'inibitur tal-metafażi (eż. kolċemid jew kolċisina), miġbur u mlewwen, u ċ-ċelloli tal-metafażi jiġu analizzati bil-mikroskopju għall-preżenza ta' aberrazzjonijiet tat-tip kromatid u tat-tip kromożomiku

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Ċelloli

Tista' tintuża firxa ta' linji ta' ċelloli (eż. Ovarji tal-Hamster Ċiniż (CHO), pulmun tal-Hamster Ċiniż V79, Pulmun tal-Hamster Ċiniż (CHL)/IU, TK6) jew kulturi ta' ċelloli primarji, inklużi linfoċiti periferiċi tad-demm tal-bniedem jew ta' mammiferi oħrajn (7). L-għażla tal-linji ta' ċelloli għandha tkun iġġustifikata xjentifikament. Meta jintużaw ċelloli prmiarji, għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' ċelloli primarji ta' oriġini umana meta dan ikun fattibbli u dawn għandhom jiġu kampjunati skont il-prinċipji u r-regolamenti etiċi umani. Il-linfoċiti periferiċi tad-demm tal-bniedem għandhom jinkisbu mingħand individwi żgħażagħ (madwar 18-35 sena) li ma jpejpux u li ma għandhom ebda marda magħrufa jew li ma kinux esposti riċentement għal aġenti ġenotossiċi (eż. sustanzi kimiċi, radjazzjonijiet jonizzanti) f'livelli li jżidu l-inċidenza ta' sfond ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi. Dan jiżgura li l-inċidenza ta' sfond ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi tibqa' baxxa u konsistenti. L-inċidenza bażi tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi tiżdied mal-età, u din it-tendenza hija iktar evidenti fin-nisa milli fl-irġiel (17) (18). Jekk jinġabru flimkien ċelloli mingħand iktar minn donatur wieħed, għandu jiġi speċifikat l-għadd ta' donaturi. Hemm bżonn li jintwera li ċ-ċelloli nqasmu sa mill-bidu nett tat-trattament bis-sustanza kimika tat-test sal-kampjunar taċ-ċelloli. Il-kulturi taċ-ċelloli jinżammu f'fażi ta' tkabbir taċ-ċelloli esponenzjali (linji ta' ċelloli) jew jiġu stimolati sabiex jinqasmu (kulturi primarji ta' linfoċiti), sabiex jesponu ċ-ċelloli fi stadji differenti taċ-ċiklu taċ-ċelloli, peress li jaf ma tkunx magħrufa s-sensittività tal-istadji taċ-ċelloli għas-sustanzi kimiċi. Iċ-ċelloli primarji li jeħtieġu stimolazzjoni b'aġenti mitoġeniċi sabiex jinqasmu ġeneralment ma jibqgħux sinkronizzati matul l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (eż. linfoċiti umani wara stimolazzjoni mitoġenika ta' 48 siegħa). L-użu ta' ċelloli sinkronizzati matul it-trattament mhuwiex rakkomandat, iżda jista' jkun aċċettabbli jekk ikun iġġustifikat.

Il-kundizzjonijiet tal-media tal-kultura

Għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tal-kultura u tal-inkubazzjoni (reċipjenti tal-kultura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO_2 jekk xieraq, temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37 °C) għaż-żamma tal-kulturi. Il-linji ta' ċelloli għandhom jiġu verifikati b'mod regolari għall-istabilità tal-għadd ta' kromożomi modali u l-assenza ta' kontaminazzjoni tal-Mikoplażma (7) (19), u ċ-ċelloli ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati jew jekk jinbidel l-għadd ta' kromożomi modali. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli tal-linji ta' ċelloli jew il-kulturi prmiarji użati fil-laboratorju tat-testijiet għandu jkun stabbilit u konsistenti mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati (20).

Preparazzjoni tal-kulturi

Linji ta' ċelloli: iċ-ċelloli huma propagati minn kulturi omm, imqegħdin fil-medium tal-kultura f'densità b'tali mod li ċ-ċelloli f'sospensjonijiet jew f'monosaffi jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali sal-ħin tal-ġbir (eż. għandha tiġi evitata konfluwenza għal ċelloli li jikbru f'monosaffi).

▼M7

Linfoċiti: demm sħiħ ittrattat b'antikoagulant (eż. eparina) jew linfoċiti separati jiġu kulturati (eż. għal 48 siegħa għal linfoċiti umani) fil-preżenza ta' mitoġenu [eż. fitoemagglutinina (PHA) għal linfoċiti umani] sabiex tiġi indotta diviżjoni taċ-ċelloli qabel l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test.

Attivazzjoni metabolika

Għandhom jintużaw sistemi metabolizzanti eżoġeni meta jintużaw ċelloli b'kapaċità metabolika endoġena inadegwata. L-iktar sistema użata spiss li hija l-ewwel rakkomandata, sakemm ma jkunx stipulat b'mod ieħor, hija frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imħejjija mill-fwied ta' rodituri (ġeneralment firien) ittrattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (21) (22) (23) jew taħlita ta' fenobarbital u β-naftoflavon (24) (25) (26) (27) (28) (29). Din it-taħlita msemmija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes (30) u ntwera li hija effettiva daqs Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidażijiet b'funzjoni mħallta (24) (25) (26) (28). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1 sa 2 % (v/v) iżda tista' tiżdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-użu ta' prodotti li jnaqqsu l-indiċi mitotiku, speċjalment prodotti ta' kumplessazzjoni tal-kalċju (31) għandu jiġi evitat matul it-trattament. L-għażla tat-tip u l-konċentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena jew induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi kimiċi li jiġu ttestjati.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 23). Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokolli standard, bħat-trattament f'reċipjenti tal-kultura ssiġillati (32) (33) (34). Il-preparamenti tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin.

Kundizzjonijiet tat-test

Solventi

Is-solvent għandu jingħażel sabiex tiġi ottimizzata s-solubilità tas-sustanza kimika tat-test mingħajr ma jitħalla impatt avvers fuq it-twettiq tal-assaġġ, eż. bidla fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-kultura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Huwa rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tal-kultura). Pereżempju, fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma jew is-sulfossidu tad-dimetil. Ġeneralment, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbżu l-1 % (v/v) u s-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbżu l-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk jintużaw solventi mhux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn dejta li tindika l-kompatibilità tagħhom mas-sustanzi kimiċi tat-test, is-sistema tat-test u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika fil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-dejta ta' sostenn, importanti li jiġu inklużi kontrolli mhux ittrattati (ara l-Appendiċi 1) sabiex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduċi ebda effett dannuż jew klastoġeniku.

Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli u ċ-ċitotossiċità u l-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-trattament

Meta wieħed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva (ara l-paragrafu 22), il-preċipitazzjoni fil-medium tal-kultura (ara l-paragrafu 23), jew bidliet ċari fil-pH jew ożmolalità (ara l-paragrafu 5). Jekk is-sustanza kimika

▼M7

tat-test tikkaġuna bidla ċara fil-pH tal-medium fi żmien iż-żieda, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali sabiex jiġu evitati riżultati pożittivi artifattwali u sabiex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-kultura.

Il-kejliet tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jsiru sabiex ikun żgurat li biżżejjed ċelloli ttrattati jkunu jilħqu l-fażi tal-mitożi waqt it-test u li t-trattamenti jsiru fil-livelli xierqa ta' ċitotossiċità (ara l-paragrafi 18 u 22). Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi stabbilita b'attivazzjoni metabolika u mingħajr fl-esperiment ewlieni bl-użu ta' indikazzjoni xierqa ta' mewt u tkabbir taċ-ċelloli. Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità f'test inizjali tista' tkun siewja sabiex jiġu definiti aħjar il-konċentrazzjonijiet li sejrin jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex obbligatorju. Jekk isir, ma għandux isir minflok il-kejl taċ-ċitotossiċità fl-esperiment ewlieni.

L-Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD) jew iż-Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC) huma metodi xierqa għall-valutazzjoni taċ-ċitotossiċità f'testijiet ċitoġenetiċi (13) (15) (35) (36) (55) (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli). Fil-każ ta' trattament fit-tul u ħinijiet tal-kampjunar wara l-bidu tat-trattament li jkunu itwal minn darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali (jiġifieri itwal minn 3 darbiet it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli b'kollox), l-RPD jista' jissottovaluta ċ-ċitotossiċità (37). F'dawn iċ-ċirkustanzi, l-RICC tista' tipprovdi kejl aħjar jew inkella l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità wara darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali tkun stima siewja bl-użu tal-RPD.

Għal linfoċiti f'kulturi primarji, filwaqt li l-indiċi mitotiku (MI) huwa kejl tal-effetti ċitotossiċi/ċitostatiċi, huwa influwenzat mill-ħin li jitkejjel fih wara t-trattament, il-mitoġenu użat u t-tkissir taċ-ċiklu ċellulari possibbli. Madankollu, l-MI huwa aċċettabbli għaliex kejliet oħrajn taċ-ċitotossiċità jistgħu jkunu diffiċili u imprattiċi u jaf ma jkunux japplikaw għall-popolazzjoni fil-mira ta' linfoċiti li jikbru bħala tweġiba għall-istimolazzjoni tal-PHA.

Filwaqt li l-RICC u l-RPD għal-linji ta' ċelloli u l-MI għall-kultura primarja ta' linfoċiti huma l-parametri rakkomandati taċ-ċitotossiċità, indikaturi oħrajn (eż. l-integrità taċ-ċelloli, l-apoptożi, in-nekrożi, iċ-ċiklu taċ-ċelloli) jistgħu jipprovdu informazzjoni addizzjonali siewja.

Għandhom jiġu evalwati tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inkluż l-kontroll tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabilità (iċ-ċitotossiċità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Ikun xi jkun it-tip taċ-ċelloli (linji ta' ċelloli jew kulturi primarji ta' linfoċiti), jistgħu jintużaw kulturi rreplikati jew kulturi uniċi ttrattati f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Filwaqt li l-użu ta' kulturi duplikati huwa rakkomandat, kulturi uniċi huma aċċettabbli wkoll diment li jingħata punteġġ lill-istess numru totali ta' ċelloli għal kulturi uniċi jew kulturi duplikati. L-użu ta' kulturi waħedhom huwa ta' rilevanza partikolari meta jiġu vvalutati iktar minn 3 konċentrazzjonijiet (ara l-paragrafu 31). Ir-riżultati miksubin fil-kulturi rreplikati indipendenti f'konċentrazzjoni partikolari jistgħu jingħabru flimkien għall-analiżi tad-dejta (38). Għal sustanzi kimiċi tat-test li

▼M7

juru tossiċità baxxa jew ebda tossiċità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-tripplu normalment ikunu xierqa. Meta sseħħ ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin għandhom ikopru firxa minn dik iċ-ċitotossiċità produttiva kif spjegat fil-paragrafu 22 u jinkludu konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossiċità moderata u baxxa jew ebda ċitotossiċità. Ħafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons wiqfin u, sabiex tinkiseb dejta f'ċitotossiċità baxxa u moderata jew sabiex tiġi studjata r-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons f'dettall, sejjer ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjoni spazjati iktar qrib xulxin u/jew iktar minn tliet konċentrazzjonijiet (kulturi waħedhom jew repliki), speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 47).

Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tikseb ċitotossiċità ta' 55 ± 5 % bl-użu tal-parametri rakkomandati dwar iċ-ċitotossiċità (jiġifieri tnaqqis fl-RICC u l-RPD għal linji ta' ċelloli u tnaqqis fl-MI għal kulturi primarji ta' linfoċiti għal 45± 5 % tal-kontroll negattiv parallel). Wieħed għandu joqgħod attent meta jinterpreta riżultati pożittivi li mbagħad jistgħu jinstabu li huma fil-parti superjuri ta' din il-firxa ta' ċitotossiċità ta' 55 ± 5 % (13).

Għal sustanzi kimiċi tat-test ftit li xejn solubbli li mhumiex ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajnuna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossiċità sseħħ f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni waħda biss li tipproduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artifattwali mill-preċipitat. Fil-konċentrazzjoni li tipproduċi preċipitat, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekkilx it-twettiq tat-test (eż. tilwin jew punteġġar). Id-determinazzjoni tas-solubilità fil-medium tal-kultura qabel l-esperiment tista' tkun utli.

Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossiċità li tillimita, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-inqas (39) (40) (41). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, il-prodotti ta' reazzjoni kumplessa jew il-materjal bijoloġiku (UVCB) (42), estratt ambjentali eċċ, il-konċentrazzjoni massima jaf trid tkun ogħla (eż. 5 mg/ml), fin-nuqqas ta' ċitotossiċità suffiċjenti, sabiex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wieħed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (43).

Kontrolli

Għal kull ħin tal-ġbir għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 15), li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u ttrattat bl-istess mod bħall-kulturi tat-trattament.

Kontrolli pożittivi paralleli huma meħtieġa sabiex juru l-ħila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' klastoġeni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat u l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena, meta applikabbli. Fit-Tabella 1 ta' hawn taħt jingħataw xi eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv oħrajn, jekk ikunu ġġustifikati. Peress li t-testijiet *in vitro* taċ-ċelloli tal-mammiferi huma standardizzati biżżejjed, l-użu tal-kontrolli pożittivi jista' jkun limitat għal klastoġenu li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. Diment li dan isir fl-istess ħin mat-test mhux attivat bl-użu tal-istess durata tat-trattament, ir-rispons tal-kontroll pożittiv uniku sejjer juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u kemm hija risponsiva s-sistema tat-test. Madankollu, trattament fit-tul (mingħajr S9) għandu jkollu l-kontroll pożittiv tiegħu stess peress li d-durata tat-trattament sejra tvarja mit-test bl-użu tal-attivazzjoni metabolika. Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'konċentrazzjoni waħda jew iktar mistennija li toffri żidiet riproduċibbli u identifikabbli fuq l-isfond sabiex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test (jiġifieri l-effetti huma ċari iżda ma jikxfux minnufih l-identità tal-lametti kodifikati lill-qarrej), u r-rispons ma għandux ikun f'riskju minħabba ċitotossiċità li taqbeż il-limiti speċifikati fil-metodu ta' ttestjar.

▼M7

Tabella 1.

Sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati għall-valutazzjoni tal-għarfien tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi.

Kategorija	Sustanza Kimika	CASRN
1. Klastoġeni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika		
	Metansulfonat tal-metil	66-27-3
	Mitomiċina C	50-07-7
	4-Nitrokinolina-N-Ossida	56-57-5
	Ċitożina arabinosida	147-94-4
2. Klastoġeni li jeħtieġu attivazzjoni metabolika		
	Benżo(a)piren	50-32-8
	Ċiklofosfammid	50-18-0

PROĊEDURA

Trattament bis-sustanza kimika tat-test

Ċelloli li jipproliferaw huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika.

Żmien il-ġbir tal-kulturi

Għal evalwazzjoni dettaljata, li tkun meħtieġa sabiex jiġi konkluż eżitu negattiv, għandhom isiru t-tliet kundizzjonijiet sperimentali kollha kemm huma li ġejjin bl-użu ta' trattament fuq terminu qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajrha u trattament fit-tul mingħajr attivazzjoni metabolika (ara l-paragrafi 43, 44 u 45):

— Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika għal 3-6 sigħat, u jiġu kampjunati f'ħin ekwivalenti għal madwar kull darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali mindu jinbeda t-trattament (18),

— Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika għal 3-6 sigħat, u jiġu kampjunati f'ħin ekwivalenti għal madwar kull darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali mindu jinbeda t-trattament (18),

— Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti bla heda għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika sal-kampjunar f'ħin għal madwar kull darba u nofs iċ-ċiklu taċ-ċelloli normali. Ċerti sustanzi kimiċi (eż. analogi nukleosidiċi) jistgħu jinqabdu iktar malajr minn ħinijiet ta' trattament/kampjunar ta' itwal minn darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali (24).

F'każ li xi waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali ta' hawn fuq twassa għal rispons pożittiv, jaf ma jkunx hemm bżonn li jiġi investigat xi wieħed mir-reġimi tat-trattament l-oħrajn.

Preparazzjoni tal-kromożomi

Il-kulturi taċ-ċelloli jiġu ttrattati b'kolċemid jew kolċisina normalment għal siegħa sa tliet sigħat qabel il-ġbir. Kull kultura ta' ċelloli tinġabar u tiġi proċessata separatament għall-preparazzjoni tal-kromożomi. Il-preparazzjoni tal-kromożomi tinvolvi t-trattament ipotoniku taċ-ċelloli, il-fissazzjoni u t-tilwin. Fil-monosaffi, iċ-ċelloli mitotiċi (identifikabbli għaliex huma tondi u maqlugħin mill-wiċċ) jistgħu jkunu preżenti fl-aħħar tat-trattament ta' bejn 3 u 6 sigħat. Minħabba li

▼M7

dawn iċ-ċelloli mitotiċi jistgħu jinqalgħu faċilment, jistgħu jintilfu meta jitneħħa l-medium li jkun fih is-sustanza kimika tat-test. Jekk hemm evidenza ta' żieda sostanzjali fin-numru ta' ċelloli mitotiċi meta mqabbla mal-kontrolli, xi ħaġa li tindika inibizzjoni mitotika, iċ-ċelloli għandhom jinġabru b'ċentrifugazzjoni u jiżdiedu lura mal-kulturi, sabiex jiġi evitat milli jintilfu ċelloli li huma f'mitożi, u f'riskju ta' aberrazzjoni kromożomika, f'ħin il-ġbir.

Analiżi

Il-lametti kollha, inklużi dawk tal-kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati b'mod indipendenti qabel ma ssir analiżi mikroskopika għal aberrazzjonijiet kromożomiċi. Billi l-proċeduri ta' fissazzjoni spiss jirriżultaw fi proporzjon ta' ċelloli fil-metafaża li tilfu kromożomi, iċ-ċelloli li jingħaddu għandu għalhekk ikun fihom numru ta' ċentromeri ugwali għan-numru modali +/– 2.

Tal-inqas 300 metafaži mifruxin sew għandhom jingħaddu għal kull konċentrazzjoni u kontroll sabiex jiġi konkluż li sustanza kimika tat-test hija negattiva biċċar (ara l-paragrafu 45). It-300 ċellola għandhom ikunu maqsumin indaqs bejn ir-repliki, meta jintużaw kulturi rreplikati. Meta jintużaw kulturi waħedhom għal kull konċentrazzjoni (ara l-paragafu 21), għandhom jingħaddu tal-inqas 300 metafaži mifruxin sew f'din il-kultura waħedha. L-għadd ta' 300 ċellola għandu l-vantaġġ li jżid is-saħħa statistika tat-test u, barra minn hekk, rari jiġu osservati valuri żero (mistennijin li jkunu 5 % biss) (44). In-numru ta' metafażijiet magħdudin jista' jitnaqqas meta jiġu osservati numri kbar ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi u s-sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva b'mod ċar.

Għandhom jingħaddu ċelloli b'aberrazzjoni(jiet) kromożomiċi strutturali, li jinkludu u jeskludu distakki. Il-ksur u d-distakki huma definiti fl-Appendiċi 1 skont (45) (46). Aberrazzjonijiet tat-tip kromatid u kromożomiku għandhom jiġu rreġistrati għalihom u jiġu kklassifikati skont is-sottotipi (ksur, skambji). Il-proċeduri li jintużaw fil-laboratorju għandhom jiżguraw li l-analiżi tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi ssir minn persuni mħarrġin sew fl-għoti ta' punteġġi u huma evalwati bejn il-pari, jekk xieraq.

Għalkemm l-għan tat-test huwa li jinkixfu aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali, huwa importanti li wieħed jirreġistra l-frekwenzi tal-poliplojdija u l-endoreduplikazzjoni meta jseħħu dawn l-avvenimenti. (Ara l-paragrafu 2).

Il-profiċjenza tal-laboratorju

Sabiex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza bit-test qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi kimiċi pożittivi ta' referenza li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti u bosta kontrolli negattivi (bl-użu ta' bosta solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontroll pożittiv u negattiv reazzjonijiet għandhom ikunu konsistenti mat-tagħrif. Dan mhuwiex applikabbli għal laboratorju li għandhom esperjernza, jiġifieri li għandhom database storika disponibbli kif definita fil-paragrafu 37.

Għandha tiġi investigata firxa ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv (ara t-Tabella 1 fil-paragrafu 26) bi trattamenti qosra u twal fin-nuqqas ta' attivazzjoni metabolika, u anki bi trattament qasir fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, sabiex tintwera l-ħila li jinqabdu sustanzi kimiċi klastoġeniċi u tiġi stabbilita l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi magħżulin sabiex jingħataw żidiet riproduċibbli u marbutin mal-konċentrazzjoni fuq l-isfond sabiex jintwerew is-sensittività u l-firxa dinamika tas-sistema tat-test.

▼M7

Dejta storika tal-kontroll

Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv,

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv (mhux ittrattat, solvent).

Meta għall-ewwel tinkiseb id-dejta għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu konsistenti mad-dejta tal-kontroll ippubblikata, meta tkun teżisti. Peress li tiżdied iktar dejta sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (44) (47). Id-database storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-inqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (48)), sabiex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u sabiex juru li l-metodoloġija hija "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (44). Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inklużjoni u l-esklużjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (47).

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tagħha mad-databases tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll.

Id-dejta tal-kontroll negattiv għandha tikkonsisti fl-inċidenza taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi minn kultura waħedha jew is-somma tal-kulturi rreplikati kif deskritti fil-paragrafu 21. Idealment, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (44) (47). Meta d-dejta tal-kontroll negattiv parallel toħroġ mil-limiti ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll diment li din id-dejta ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 37) u evidenza ta' nuqqas ta' żball tekniku jew uman.

DEJTA U RAPPORTAR

Preżentazzjoni tar-riżultati

Il-perċentwal ta' ċelloli b'aberrazzjoni(jiet) kromożomika strutturali għandu jiġi evalwat. L-aberrazzjonijiet tat-tip kromatid u kromożomiku kklassifikat skont is-sottotipi (ksur, skambji) għandhom jiġu elenkati b'mod separat bin-numri u l-frekwenzi tagħhom għall-kulturi ta' esperimenti u ta' kontroll. Id-distakki jiġu rreġistrati u rrapportati separatament u ma jiddaħħlux fil-frekwenza ta' aberrazzjonijiet totali. Il-perċentwal ta' poliplojdija u/jew ċelloli endoreduplikati jiġi rrapportat meta jiġi osservat.

Għandhom jiġu rreġistrati l-miżuri paralleli ta' ċitotossiċità għall-kulturi tal-kontroll ittrattat, negattiv u pożittiv kollha fl-esperiment(i) tal-aberrazzjonijiet ewlenin.

Għandha tiġi pprovduta dejta dwar il-kultura individwali. Barra minn hekk, id-dejta kollha għandha tinġabar taħt forma ta' tabella.

Kriterji ta' Aċċettabilità

L-aċċettazzjoni ta' test hija bbażata fuq il-kriterji li ġejjin:

— Il-kontroll negattiv parallel jitqies aċċettabbli għaż-żieda fid-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 39.

▼M7

— Il-kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 26) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fid-database storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv parallel.

— Il-kriterji ta' proliferazzjoni taċ-ċelloli fil-kontroll tas-solventi għandhom ikunu ssodisfati (paragrafi 17 u 18).

— It-tliet kundizzjonijiet sperimentali kollha kemm huma ġew ittestjati sakemm wieħed ma rriżultax f'riżultati pożittivi (ara l-paragrafu 28).

— Hemm numru adegwat ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet li huma analizzabbli (paragrafi 31 u 21).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 22, 23 u

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati (ara l-paragrafu 28):

a) tal-inqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel,

b) iż-żieda hija marbuta mad-doża meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

c) kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson; ara l-paragrafu 39).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli kulturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (49) (50) (51).

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali analizzati kollha (ara l-paragrafu 28):

a) l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel,

b) ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

c) ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson; ara l-paragrafu 39).

Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli kulturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test.

Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

F'każ li r-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq jew sabiex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-dejta għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. L-ikklassifikar ta' ċelloli addizzjonali (fejn xieraq) jew it-twettiq ta' esperiment ripetut possibilment bl-użu ta' kundizzjonijiet modifikati tal-esperiment (eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet, kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika oħrajn (jiġifieri konċentrazzjoni S9 jew oriġini S9)) jista' jkun siewi.

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' dejta sejjer jipprekludi l-ħruġ ta' konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u, għalhekk, ir-rispons tas-sustanza kimika tat-test sejjer jiġi konkluż bħala ekwivoku.

▼M7

Żieda fin-numru ta' ċelloli poliplojdi tista' tindika li s-sustanzi kimiċi tat-test għandhom il-potenzjal li jinibixxu l-proċessi mitotiċi u jwasslu aberrazzjonijiet kromożomiċi numeriċi (52). Żieda fin-numru ta' ċelloli bi kromożżomi endoreduplikati tista' tindika li s-sustanzi kimiċi tat-test għandhom il-potenzjal li jinibixxu l-progress taċ-ċiklu taċ-ċelloli (53) (54) (ara l-paragrafu 2). Għaldaqstant, l-inċidenza ta' ċelloli poliplojdi u ċelloli bi kromożomi endoreduplikati għandha tiġi rreġistrata b'mod separat.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli

— l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, l-ożmolalità u l-preċipitat fil-medium tal-kultura li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solventi:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent.

— il-perċentwal ta' solvent fil-medium tal-kultura finali għandu jiġi indikat ukoll.

Ċelloli:

— tip u sors taċ-ċelloli

— karatteristiċi karjotipiċi u l-adegwatezza tat-tip ta' ċellola użat;

— in-nuqqas ta' mikoplażma, għal-linji ta' ċelloli;

— għal-linji ta' ċelloli, informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċellola, il-ħin għall-irduppjar jew l-indiċi tal-proliferazzjoni;

— is-sess tad-donaturi tad-demm, l-età u kwalunkwe informazzjoni rilevanti dwar id-donatur, id-demm sħiħ jew il-linfoċiti separati, il-mitoġenu użat;

— in-numru ta' passaġġi, jekk disponibbli, għal-linji ta' ċelloli;

— il-metodi għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli, għal-linji ta' ċelloli;

— in-numru modali ta' kromożomi, għal-linji ta' ċelloli.

▼**M7**

Kundizzjonijiet tat-test:

— l-identità tal-inibitur tal-metafaži, il-konċentrazzjoni tiegħu u d-durata tal-esponiment taċ-ċelloli;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tal-kultura (eż. µg jew mg/mL jew mM tal-medium tal-kultura).

— ir-raġuni prinċipali għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u l-għadd ta' kulturi inklużi, eż. dejta dwar iċ-ċitotossiċità u limitazzjonijiet tas-solubilità;

— il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni tas-CO_2 jekk applikabbli, il-livell ta' umdità;

— il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) ta' solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tal-kultura;

— it-temperatura ta' inkubazzjoni;

— il-ħin ta' inkubazzjoni;

— id-durata tat-trattament;

— il-ħin tal-ġbir wara t-trattament;

— id-densità taċ-ċelloli fiż-żriegħ, jekk xieraq;

— it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-taħlita ta' S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' taħlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tal-kultura finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9);

— is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali għal kull kundizzjoni tat-trattament;

— il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti u t-teknika użata għat-tilwin;

— il-kriterji għall-aċċettabilità tal-assaġġi;

— il-kriterji għall-ikklassifikar tal-aberrazzjonijiet;

— in-numru ta' metafażijiet analizzati;

— il-metodi għall-kejl taċ-ċitotossiċità;

— kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossiċità u l-metodu użat;

— il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

— il-metodi użati sabiex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità u l-preċipitazzjoni.

Ir-riżultati:

— l-għadd ta' ċelloli ttrattati u l-għadd ta' ċelloli miġburin għal kull kultura meta jintużaw il-linji ta' ċelloli

— il-kejliet taċ-ċitotossiċità, eż. RPD, RICC, MI, osservazzjonijiet oħrajn, jekk ikun hemm;

— informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli, il-ħin għall-irduppjar jew l-indiċi tal-proliferazzjoni fil-każ tal-linji ta' ċelloli;

— is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-ħin tad-determinazzjoni;

▼**M7**

— id-definizzjoni għall-aberrazzjonijiet, inklużi d-distakki;

— In-numru ta' ċelloli kklassifikati, in-numru ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi u t-tip ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi mogħtijin b'mod separat għal kull kultura ttrattata u tal-kontroll, inklużi u eskluži d-distakki;

— bidliet fil-plojdija (ċelloli poliplojdi u ċelloli bi kromożomi endoreduplikati, mogħtijin b'mod separat), jekk jiġu osservati;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— id-dejta tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventI) parallel;

— id-dejta tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv, b'meded, medji u devjazzjonijiet standard u limiti ta' kontroll ta' 95 % għad-distribuzzjoni, kif ukoll in-numru ta' dejta;

— analiżijiet statistiċi, il-valuri p, jekk ikun hemm.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjonijiet.

TAGĦRIF

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) (1976), "Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", in Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), "The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture" fi *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.

(4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), "Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.

(6) Il-Kapitolu B.49 ta' dan l-Anness: *Test In Vitro tal-Mikronukleu taċ-Ċelloli tal-Mammiferi.*

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

(9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼**M7**

(11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

(14) Kirkland, D. *et al*. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.

(18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.

(19) Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

(20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pp. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

(25) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

(26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼M7

(27) Matsushima, T. *et al*. (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems" in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponibbli fuq: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids" in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(33) Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(34) Asakura, M. *et al*. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(35) Lorge, E. *et al*. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(36) Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponibbli fuq talba.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, pp. 36-43.

▼**M7**

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponibbli fuq: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al*. (1990), "Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*", in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), "Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pp. 139-149.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Anewplojdija: kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Apoptożi: mewta programmata taċ-ċelloli kkaratterizzata minn sensiela ta' passi li jwasslu għal diżintegrazzjoni taċ-ċelloli fil-partikoli mwaħħlin mal-membrana li mbagħad jiġu eliminati permezz ta' fagoċitożi jew permezz ta' tixrid.

Proliferazzjoni taċ-ċelloli: żieda fl-għadd ta' ċelloli bħala riżultat ta' diviżjoni mitotika taċ-ċelloli.

Sustanza kimika: sustanza jew taħlita.

Ksur tal-kromatid: diskontinwità ta' kromatid wieħed fejn ikun hemm nuqqas ta' allinjament ċar ta' wieħed mill-kromatidi.

Distakk kromatidu: reġjun mingħajr tilwin (leżjoni akromatika) ta' kromatid wieħed fejn ikun hemm nuqqas minimu ta' allinjament tal-kromatid.

Aberrazzjoni tat-tip tal-kromatidi: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-ġdid bejn kromatidi.

Aberrazzjoni tat-tip tal-kromożomi: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-ġdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

Klastoġenu: kwalunkwe sustanza kimika li tikkawża aberrazzjonijiet kromożomiċi f'popolazzjonijiet ta' ċelloli jew organiżmi ewkarjotiċi.

Konċentrazzjonijiet: irreferi għal konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tal-kultura.

Ċitotossiċità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar li jużaw linji ta' ċelloli, iċ-ċitotossiċità hija identifikata bħala tnaqqis fl-irduppjar relattiv tal-popolazzjoni (RPD) jew iż-żieda relattiva fl-għadd taċ-ċelloli (RICC) taċ-ċelloli ttrattati meta mqabblin mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 17 u l-Appendiċi 2). Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar li jużaw kulturi primarji ta' linfoċiti, iċ-ċitotossiċità hija identifikata bħala tnaqqis fl-indiċi mitotiku (MI) taċ-ċelloli ttrattati meta mqabblin mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 18 u l-Appendiċi 2).

Endoreduplikazzjoni: proċess li bih wara perjodu S tar-replikazzjoni tad-DNA, in-nukleu ma jidħolx f'mitożi iżda jibda perjodu S ieħor. Ir-riżultat huwa kromożomi b'4, 8, 16,… il-kromatid.

Ġenotossiċi: terminu ġenerali li jkopri t-tipi kollha ħsara lid-DNA jew lill-kromożomi, inklużi ksur, tħassiriet, addotti, modifiki u konnessjonijiet tan-nukleotidi, riarranġamenti, mutazzjonijiet tal-ġeni, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew ħsara fil-kromożomi stabbli.

Indiċi mitotiku (MI): il-proporzjon ta' ċelloli fil-metafaża diviż bin-numru totali ta' ċelloli osservati f'popolazzjoni ta' ċelloli; indikazzjoni tal-livell ta' profilerazzjoni ta' dik il-popolazzjoni.

Mitożi: diviżjoni tan-nukleu taċ-ċelloli li normalment jinqasam fi profaża, prometafaża, metafaża, anafaża u telofaża.

Mutaġeniku: jipproduċi bidla ereditarja ta' sekwenza(i) tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

▼M7

Aberrazzjoni numerika: bidla fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristku normali ta' ċelloli użati.

Poliplojdija: aberrazzjonijiet kromożomiċi numeriċi f'ċelloli jew organiżmi li jinvolvu sett(ijiet) sħiħ(sħaħ) ta' kromożomi, għall-kuntrarju ta' kromożomu jew kromożomi individwali (anewplojdija).

Status p53: il-proteina p53 hija involuta fir-regolamentazzjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli, l-apoptożi u t-tiswija tad-DNA. Ċelloli b'defiċjenza fil-proteina p53 funzjonali, li mhux kapaċi jinibixxu ċ-ċiklu taċ-ċelloli jew jelimintaw iċ-ċelloli bil-ħsara b'apoptożi jew mekkaniżmi oħrajn (eż. induzzjoni tat-tiswija tad-DNA) marbutin mal-funzjonijiet p53 f'rispons għall-ħsara fid-DNA, teoretikament għandhom ikunu iktar suxxettibbli għal mutazzjonijiet tal-ġeni jew aberrazzjonijiet kromożomiċi.

Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC): iż-żieda fin-numru ta' ċelloli f'kulturi esposti għas-sustanza kimika kontra żieda f'kulturi mhux ittrattati, proporzjon espress bħala perċentwal.

Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD): iż-żieda fin-numru ta' raddoppji tal-popolazzjoni f'kulturi esposti għas-sustanza kimika kontra żieda f'kulturi mhux ittrattati, proporzjon espress bħala perċentwal.

Frazzjoni tal-fwied S9: supernatant ta' omoġenat tal-fwied wara ċentrifugazzjoni ta' 9 000 g, jiġifieri estratt minn fwied mhux ipproċessat.

Taħlita ta' F9: taħlita tal-frazzjoni tal-fwied S9 u l-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metaboliċi.

Kontrolli tas-solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kulturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent waħdu użat sabiex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Aberrazzjoni strutturali: bidla fl-istruttura tal-kromożomi li wieħed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku tal-istadju metafażiku tad-diviżjoni taċ-ċelluoli, osservati bħala tħassir u biċċiet, bidliet minn ġewwa u bidliet bejniethom.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Kontrolli mhux ittrattati: kulturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri ebda sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu pproċessati fl-istess ħin bl-istess mod bħall-kulturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

▼M7

Appendiċi 2

FORMOLI GĦALL-VALUTAZZJONI TAĊ-ĊITOTOSSIĊITÀ

Indiċi mitotiku (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Number of mitotic cells}}{\text{Total number of Cells scored}} \times 100$$

Iż-Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC) jew **l-Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD)**, minħabba li t-tnejn iqisu l-proporzjon tal-popolazzjoni taċ-ċelloli li tkun iddividiet ruħha.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{Increase in numbers of cells in control cultures}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{No.of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No.of population doublings in control cultures})} \times 100$$

fejn:

Irduppjar tal-Popolazzjoni = [log (Numru ta' ċelloli wara t-trattament ÷ Numru ta' ċelloli inizjali)] ÷ log 2

Pereżempju, RICC, jew RPD ta' 53 % jindikaw ċitotossiċità/ċitostaži ta' 47 % u ċitotossiċità/ċitostaži ta' 55 % imkejla bl-MI tfisser li l-MI attwali huwa 45 % tal-kontroll.

Fi kwalunkwe każ, l-għadd ta' ċelloli qabel it-trattament għandu jitkejjel u l-istess għal kulturi ttrattati u tal-kontroll negattiv.

Filwaqt li l-RCC (jiġifieri n-Numru ta' ċelloli f'kulturi tat-trattament/ Numru ta' ċelloli f'kulturi tal-kontroll) intuża bħala parametru taċ-ċitotossiċità fl-imgħoddi, illum ma għadux rakkomandat għaliex jista' jissottovaluta ċ-ċitotossiċità

Fil-kulturi tal-kontroll negattiv, l-irduppjar tal-popolazzjoni għandu jkun kompatibbli mar-rekwiżit li jittieħed kampjun taċ-ċelloli wara t-trattament fi żmien ekwivalenti għal madwar darba u nofs it-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli u l-indiċi mitotiku għandu jkun għoli biżżejjed sabiex jinkiseb numru suffiċjenti ta' ċelloli fil-mitoži u sabiex jiġi kkalkolat b'mod affidabbli tnaqqis ta' 50 %.

▼M7

B.11. **TEST TAL-ABERRAZZJONI FIL-KROMOŻOMI TAL-MUDULLUN TAL-MAMMIFERI**

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 475 (2016) tal-OECD Huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Ġie żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (1).

It-test *in vivo* tal-aberrazzjoni fil-kromożomi tal-mudullun tal-mammiferi huwa ta' rilevanza partikolari għall-valutazzjoni tal-ġenotossiċità għaliex, għad li jvarja bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetiċi u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-risponsi. Assaġġ *in vivo* huwa siewi wkoll sabiex tkun tista' ssir investigazzjoni ulterjuri tal-ġenotossiċità żvelata minn sistema *in vitro*.

It-test *in vivo* ta' aberrazzjoni kromożomika fil-mammiferi jintuża sabiex jinstabu aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali indotti mis-sustanzi kimiċi tat-test fiċ-ċelloli tal-mudullun tal-annimali, normalment rodituri (2) (3) (4) (5). L-aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali jistgħu jkunu ta' żewġ tipi, kromożomiċi jew kromatidi. Filwaqt li l-maġġoranza ta' aberrazzjonijiet ġenotossiċi indotti bis-sustanzi kimiċi huma tat-tip kromatid, jistgħu jseħħu aberrazzjonijiet tat-tip kromożomiku wkoll. Il-ħsara kromożomika u l-avvenimenti relatati huma l-kawża ta' ħafna mard ġenetiku fil-bniedem u hemm evidenza sostanzjali li, meta dawn il-leżjonijiet u l-avvenimenti relatati jikkaġunaw alterazzjonijiet f'onkoġeni u f'ġeni li jrażżnu t-tumuri, dawn ikunu involuti fil-ħolqien tal-kanċer fil-bniedem u sistemi sperimentali. Tista' sseħħ piloplojdija (inkluża endoreduplikazzjoni) f'assaġġi tal-aberrazzjoni kromożomika *in vivo*. Madankollu, żieda fil-poliplojdija waħedha ma tindikax potenzjal anewġeniku u tista' tindika sempliċi perturbazzjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli jew ċitotossiċità. It-test mhuwiex imfassal sabiex ikejjel l-anewplojdija. Test *in vivo* tal-mikronukleu fl-eritroċiti mammiferi (Kapitolu B.12 ta' dan l-Anness) jew it-test *in vitro* tal-mikronukleu taċ-ċelloli tal-mammiferi (Kapitolu B.49 ta' dan l-Anness) ikunu t-testijiet *in vivo* u *in vitro*, rispettivament, rakkomandati għas-sejbien ta' anewplojdija.

Id-definizzjonijiet tat-terminoloġija użata huma stabbiliti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

F'dan it-test spiss jintużaw rodituri, iżda f'ċerti każijiet jista' jkun hemm speċijiet oħrajn li jkunu xierqa, jekk ikunu ġġustifikati xjentifikament. Il-mudullun huwa t-tessut fil-mira ta' dan it-test, peress li huwa tessut ferm vaskularizzat u fih popolazzjoni ta' ċelluli b'ċiklu rapidu li jistgħu jkunu faċilment iżolati u pproċessati. Fir-rapport għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika meta jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex firien u ġrieden. Jekk jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex rodituri, huwa rakkomandat li l-kejl tal-aberrazzjoni kromożomika tal-mudullun jiġi integrat f'test xieraq ieħor tat-tossiċità.

Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, mhumiex sejrin jilħqu t-tessut fil-mira, jaf ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

▼M7

IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

L-annimali huma esposti għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' rotta xierqa ta' esponiment u jiġu ewtanazzati b'mod umanitarju fi żmien xieraq wara t-trattament. Qabel l-ewtanażija, l-annimali jiġu ttrattati b'inibitur tal-metafaži (eż. kolċisina jew kolċemid). Imbagħad isiru preparazzjonijiet tal-kromożomi miċ-ċelloli tal-mudullun u dawn jitlewnu, u ċ-ċelluli fil-metafaži jiġu analizzati għal aberrazzjonijiet kromożomiċi.

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

Investigazzjonijiet tal-Profiċjenza

Sabiex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza fit-twettiq tal-assaġġ qabel ma jintuża għal testijiet ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun wera li għandu l-ħila li jirriproduċi r-riżultati mistennijin mid-dejta ppubblikata (eż. (6)) għal frekwenzi ta' aberrazzjonijiet kromożomatiċi b'tal-inqas żewġ sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfin indotti minn doži baxxi ta' kontrolli pożittivi), bħal dawk elenkati fit-Tabella 1 u b'kontrolli tal-veikolu/solvent kompatibbli (ara l-paragrafu 22). Dawn l-esperimenti għandhom jużaw doži li jagħtu żidiet riproduċibbli u relatati mad-doži u juru s-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test fit-tessut ta' interess (il-mudullun) u jużaw il-metodu tal-punteġġ li sejjer jitħaddem fil-laboratorju. Dan ir-rekwiżit mhuwiex applikabbli għal laboratorji li għandhom esperjenza, jiġifieri li għandhom database storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 10-14.

Dejta Storika tal-Kontroll

Matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza, il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv, u

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv.

Meta għall-ewwel tinkiseb id-dejta għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu konsistenti mad-dejta tal-kontroll ippubblikata, meta tkun teżisti. Peress li tiżdied iktar dejta sperimentali mad-distribuzzjoni storika tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni. Id-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju għandha tkun statistikament robusta sabiex tiġi żgurata l-ħila tal-laboratorju sabiex jivvaluta d-distribuzzjoni tad-dejta tal-kontroll negattiv tiegħu. It-tagħrif jissuġġerixxi li jista' jkun hemm bżonn ta' minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment ikun hemm tal-inqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (7)), sabiex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-dejta tagħhom, u sabiex juru li l-metodoloġija hija "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom. Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inklużjoni u l-esklużjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (8).

Meta l-laboratorju ma jagħmilx numru kbir biżżejjed ta' esperimenti sabiex jistabbilixxi distribuzzjoni statistikament robusta tal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 11) matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza (deskritti fil-paragrafu 9), jista' jiġi aċċettat li d-distribuzzjoni tinbena matul l-ewwel testijiet ta' rutina. Dan l-approċċ għandu jsegwi r-rakkomandazzjonijiet stipulati fit-tagħrif (8) u r-riżultati tal-kontroll negattiv miksubin f'dawn l-esperimenti għandhom jibqgħu konsistenti mad-dejta ppubblikata tal-kontroll negattiv.

▼M7

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-impatt tagħha fuq kemm id-dejta li tirriżulta tibqa' konsistenti mad-database storika eżistenti tal-kontroll tal-laboratorju. Inkonsistenzi kbar biss għandhom jirriżultaw fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll, fejn il-ġudizzju tal-esperti jistabbilixxi li tvarja mid-distribuzzjoni ta' qabel (ara l-paragrafu 11). Matul l-istabbiliment mill-ġdid, jaf ma jkunx hemm bżonn ta' database sħiħa tal-kontroll negattiv sabiex ikun jista' jsir test propju, diment li l-laboratorju jkun jista' juri li l-valuri tal-kontroll negattiv parallel tiegħu jibqgħu konsistenti mad-database ta' qabel jew mad-dejta ppubblikata korrispondenti.

Id-dejta tal-kontroll negattiv għandha tikkonsisti fl-inċidenza tal-aberrazzjoni kromożomika strutturali (eskluži d-distakki) f'kull annimal. Idealment, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju. Meta d-dejta tal-kontroll negattiv parallel toħroġ mil-limiti ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll diment li din id-dejta ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 11) u ebda evidenza ta' żball tekniku jew uman.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Għażla ta' speċi tal-annimali

Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali żgħar b'saħħithom. Il-firien jintużaw l-iktar spiss, għad li l-ġrieden jistgħu jkunu adattati wkoll. Tista' tintuża kwalunkwe speċi ta' mammiferi xierqa oħra, jekk tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika fir-rapport.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali

Għar-rodituri, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). Għad li, idealment, l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun tal-inqas 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Ir-rodituri għandhom jitrabbew fi gruppi żgħar (mhux iktar minn ħamsa f'gaġġa) tal-istess sess u grupp tat-trattament jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva, idealment f'gaġeġ solidi mal-art bl-arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom biss jekk dan ikollu ġustifikazzjoni xjentifika.

Preparazzjoni tal-annimali

Normalment jintużaw annimali adulti żgħar b'saħħithom (għal rodituri, idealment 6-10 ġimgħat fil-bidu tat-trattament, għad li jistgħu jiġu aċċettati annimali ftit ixjaħ ukoll), u dawn jiġu assenjati b'mod aleatorju għall-gruppi tal-kontroll u tat-trattament. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu umanitarju u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikroċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fil-widnejn jew fis-swaba') u jitħallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-inqas ħamest ijiem. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u s-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju ta' kull sess.

Preparazzjoni tad-doża

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi jew veikoli xierqa jew jitħalltu f'dieta jew ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew

▼M7

jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponimenti bit-teħid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

Solvent/veikolu

Is-solvent/veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doża użati, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħrajn li mhumiex magħrufin sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' dejta ta' referenza li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Huwa rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetilċelluloża, żejt taż-żebbuġa u żejt tal-qamħirrum. Fin-nuqqas ta' dejta storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huma indotti ebda aberrazzjoni strutturali jew effett dannuż ieħor minn solvent/veikolu atipiku magħżul, għandu jsir studju inizjali sabiex tiġi stabbilita l-aċċettabbiltà tal-kontroll tas-solvent/veikolu.

Kontrolli

Kontrolli pożittivi

Normalment għandu jkun inkluż grupp ta' annimali ttrattati b'sustanza kimika tal-kontroll pożittiv ma' kull test. Dan jista' jiġi rrinunzjat meta l-laboratorju tal-ittestjar ikollu profiċjenza murija fit-twettiq tat-test u jkun stabbilixxa medda storika tal-kontroll pożittiv. Meta ma jkunx hemm grupp tal-kontroll pożittiv parallel inkluż, il-kontrolli tal-punteġġ (lametti fissi u mhux imlewnin) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Dawn jistgħu jinkisbu billi fl-ikklassifikar tal-istudju jiddaħħlu kampjuni ta' referenza xierqa li nkisbu u nħażnu minn esperiment tal-kontroll pożittiv separat imwettaq b'mod perjodiku (eż. kull 6-18-il xahar) fil-laboratorju fejn isir it-test; pereżempju, matul l-ittestjar tal-profiċjenza u fuq bażi regolari wara, fejn ikun hemm bżonn.

Is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv għandhom jipproduċu b'mod affidabbli żieda identifikabbli fil-frekwenza taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fuq il-livell spontanju. Id-dożi tal-kontroll pożittiv għandhom jingħażlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tal-kampjuni kodifikati lil min jaqrahom. Huwa aċċettabbli li l-kontroll pożittiv jingħata b'rotta differenti mis-sustanza kimika tat-test, bl-użu ta' skeda tat-trattament differenti, u li l-kampjunar iseħħ biss f'waqt partikolari biss. Barra minn dan, jista' jiġi kkunsidrat l-użu ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv relatati mal-klassi tas-sustanzi kimiċi, meta xieraq. Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv.

Tabella 1

Eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv

Sustanza Kimika	CASRN
Metansulfonat tal-etil	62-50-0
Metansulfonat tal-metil	66-27-3
Nitrosurea tal-etil	759-73-9
Mitomiċina C	50-07-7
Ċiklofosfamida (monoidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenmelamina	51-18-3

▼M7

Kontrolli negattivi

L-annimali tal-grupp tal-kontroll negattiv għandhom ikunu inklużi f'kull ħin tal-kampjunar u l-bqija jiġu mmaniġġjati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, ħlief li ma jirċivux trattament bis-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent/veikolu fl-għoti tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi dan is-solvent/il-veikolu. Madankollu, jekk jintwera li hemm varjabbiltà konsistenti bejn l-annimali u frekwenzi ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet strutturali permezz ta' dejta storika tal-kontroll negattiv f'kull waqt tal-kampjunar għal-laboratorju tal-ittestjar, jaf ikun hemm bżonn ta' kampjunar wieħed biss għall-kontroll negattiv. Meta jintuża kampjunar wieħed għall-kontrolli negattivi, għandu jkun l-ewwel waqt tal-kampjun użat fl-istudju.

PROĊEDURA

In-numru u s-sess tal-annimali

B'mod ġenerali, ir-rispons tal-mikronukleu huwa simili bejn l-annimali rġiel u nisa (9) u mhuwiex mistenni li dan sejjer iseħħ ukoll għal aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali; għalhekk, ħafna mill-istudji jistgħu jsiru f'kull sess. Dejta li turi d-differenzi rilevanti bejn l-irġiel u n-nisa (eż. differenzi fit-tossiċità sistemika, il-metaboliżmu, il-bijodisponibilità, it-tossiċità tal-mudullun, eċċ. inkluż, eż. studju għat-tiftix tal-medda) tħeġġeġ l-użu taż-żewġ sessi. F'dan il-każ, jaf ikun xieraq li jsir studju fiż-żewġ sessi, eż. bħala parti minn studju ripetut tat-tossiċità tad-doża. Jaf ikun xieraq li jintuża d-disinn fattorjali f'każ li jintużaw iż-żewġ sessi. Dettalji dwar kif tiġi analizzata d-dejta bl-użu ta' dan id-disinn huma mogħtijin fl-Appendiċi 2.

Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju għandhom jiġu stabbiliti bil-għan li jiġu pprovduti tal-inqas 5 annimali analizzabbli ta' sess wieħed, jew ta' kull sess jekk jintużaw it-tnejn, għal kull grupp. Fejn l-esponiment umana għas-sustanzi kimiċi tista' tkun speċifika għas-sess, bħal ma jseħħ pereżempju għal ċerti prodotti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq. Bħala gwida għal rekwiżiti tipiċi massimi tal-annimali, studju fil-mudullun f'żewġ waqtiet tal-kampjunar bi tliet gruppi tad-doża u grupp tal-kontroll negattiv parallel, flimkien ma' grupp tal-kontroll pożittiv (kull grupp imsawwar minn ħames annimali ta' sess uniku), ikun jeħtieġ 45 annimal.

Livelli tad-doża

Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda dejta xierqa diġà disponibbli sabiex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jrid jintuża fl-istudju ewlieni (10). L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala l-ogħla doża li sejra tiġi tollerata mingħajr evidenza ta' tossiċità li tillimita l-istudju, b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, billi tiġi indotta dipressjoni tal-piż tal-ġisem jew ċitotossiċità tas-sistema ematopoetika), iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigħ, tbatija jew diffikultà li jeħtieġu ewtanażja umanitarja (11).

L-ogħla doża tista' tiġi definita wkoll bħala doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità għall-mudullun.

Sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni tal-proprjetajiet tossikokinetiċi, jew jinduċu proċessi ta' ditossifikazzjoni li jistgħu jwasslu għal tnaqqis fl-esponiment wara trattament fit-tul jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' ssettar tad-doži u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

Sabiex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju sħiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv u tal-inqas tliet livelli ta' doži ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda mhux ikbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċix tossiċità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-dejta eżistenti, l-ogħla doża għal amministrazzjoni waħda għandha tkun ta' 2 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tossiċità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew

▼M7

ebda tossiċità. Meta tiġi osservata tossiċità tat-tessut fil-mira (il-mudullun) fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, huwa rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'dożi mhux tossiċi. Studji li jkollhom l-għan li jikkaratterizzaw iktar bis-sħiħ l-informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża jistgħu jeħtieġu gruppi tad-doża addizzjonali. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn rekwiżiti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw.

Test tal-limitu

Jekk l-esperimenti għat-tiftix tal-medda, jew dejta eżistenti minn razez ta' annimali relatati, jindikaw li reġim tat-trattament ta' tal-inqas id-doża limitu (deskritta hawn taħt) ma jipproduċi ebda effett tossiku osservabbli (inkluż ebda dipressjoni tal-proliferazzjoni tal-mudullun jew evidenza oħra ta' ċitotossiċità tat-tessut fil-mira), u jekk ma tkunx mistennija ġenotossiċità fuq il-bażi ta' studji *in vitro* tal-ġenotossiċità jew dejta minn sustanzi kimiċi relatati strutturalment, f'dak il-każ jaf ma jitqiesx neċessarju li jsir studju sħiħ li juża tliet livelli tad-doża, diment li jkun intwera li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tilħaq it-tessut fil-mira (il-mudullun). F'dawn il-każijiet, livell tad-doża wieħed, fid-doża limitu, jista' jkun biżżejjed. Għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' > 14-il jum, id-doża limitu hija ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew inqas, id-doża limitu hija 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum.

Amministrazzjoni tad-doża

Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħażlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-teħid man-nifs, intratrakeali, jew b'impjant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħażel sabiex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Ġeneralment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li mhijiex rotta intiża ta' esponiment tal-bniedem, u għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew l-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wieħed, wieħed għandu joqgħod attent li l-ħin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u l-kampjunar ikun biżżejjed sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (ara l-paragrafi 33-34). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw massimu ta' 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ikbar minn dan għandu jkun iġġustifikat. Ħlief għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment jipproduċu effetti aggravati f'konċentrazzjonijiet ikbar, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandu jitnaqqas kemm jista' jkun billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni sabiex tiġi żgurata amministrazzjoni ta' volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

Skeda tat-trattament

Normalment is-sustanzi kimiċi tat-test jingħataw bħala trattament wieħed, iżda jistgħu jingħataw bħala doża maqsuma (jiġifieri żewġ trattamenti jew iktar fl-istess ġurnata separati b'mhux iktar minn sagħtejn jew tlieta) sabiex jiġi ffaċilitat l-għoti ta' volum kbir. F'dawn iċ-ċirkustanzi, jew meta s-sustanza kimika tat-test tingħata bit-teħid man-nifs, il-ħin tal-kampjunar għandu jiġi skedat fuq il-bażi tal-ħin tal-aħħar dożaġġ jew tmiem l-esponiment.

Ftit li xejn hemm dejta disponibbli dwar l-adegwatezza ta' protokoll ta' doża ripetuta għal dan it-test. Madankollu, fiċ-ċirkustanzi li fihom ikun xieraq li jiġi integrat dan it-test b'test dwar it-tossiċità b'doża ripetuta, wieħed għandu joqgħod attent li jevita milli jintilfu ċelloli mitotiċi bi ħsara fil-kromożomi, xi ħaġa li tista'

▼M7

sseħħ b'dożi tossiċi. Integrazzjoni bħal din tkun aċċettabbli meta l-ogħla doża tkun ikbar jew daqs id-doża limitu (ara l-paragrafu 29) u grupp tad-doża jingħata d-doża limitu għad-durata tal-perjodu tat-trattament. It-test tal-mikronukleu (il-metodu ta' ttestjar B.12) għandu jitqies bħala t-test in vivo tal-għażla għal aberrazzjonijiet kromożomiċi meta tkun mixtieqa integrazzjoni ma' studji oħrajn.

Għandhom jittieħdu kampjuni tal-mudullun f'żewġ ħinijiet separati wara trattamenti uniċi. Għal roddituri, l-ewwel intervall ta' kampjunar għandu jkun il-ħin neċessarju sabiex jgħaddu darba u nofs it-tul taċ-ċiklu normali taċ-ċelloli (b'dan tal-aħħar li normalment ikun 12-18-il siegħa wara l-perjodu tat-trattament). Ladarba l-ħin meħtieġ għall-bidu u l-metaboliżmu tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test kif ukoll l-effetti tagħha fuq il-kinetika taċ-ċikli taċ-ċelloli jistgħu jaffettwaw il-ħin ottimali sabiex wieħed jintebaħ bl-aberrazzjoni kromożomika, huwa rakkomandat li jittieħed kampjun ieħor 24 siegħa wara li jkun ittieħed l-ewwel kampjun. Fl-ewwel ħin tal-kampjunar, il-gruppi kollha tad-doża għandhom jiġu ttrattati u jinġabru kampjuni għall-analiżi; madankollu, fil-ħin(ijiet) tal-kampjunar iktar tard, l-ogħla doża biss trid tingħata. Jekk jintużaw reġimi tad-dożi ta' iktar minn ġurnata fuq il-bażi ta' ġustifikazzjoni xjentifika, ġeneralment għandu jintuża ħin tal-kampjunar wieħed sa madwar darba u nofs it-tul taċ-ċiklu normali taċ-ċelloli wara t-trattament finali.

Wara t-trattament u qabel il-ġbir tal-kampjun, l-annimali jingħataw injezzjoni intraperitoneali b'doża xierqa ta' inibitur tal-metafażi (eż. kolċemid jew kolċisina), u l-kampjuni jinġabru f'intervall xieraq wara. Għall-ġrieden, dan l-intervall huwa ta' madwar 3-5 qabel il-ġbir u, għall-firien, huwa sagħtejn sa 5 sigħat. Iċ-ċelloli jinġabru mill-mudullun u jitkabbru, jiġu ffissati u mlewna, u analizzati għal aberrazzjonijiet kromożomiċi (12).

Osservazzjonijiet

Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-inqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u fil-waqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrin jidhru l-iktar l-effetti antiċipati. Tal-inqas darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' dożaġġ, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju, tal-inqas darba fil-ġimgħa matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-fażi tal-ewtanażja. Fi studji twal tal-inqas ġimgħa, il-kejliet tal-konsum tal-ikel għandhom isiru tal-inqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-inqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanazzati b'mod umanitarju qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (11).

Esponiment tat-tessut fil-mira

Għandu jittieħed kampjun tad-demm f'ħin(ijiet) xieraq sabiex ikunu jistgħu jiġu mixtarra l-livelli ta' plażma tas-sustanzi kimiċi tat-test bil-għan li jintwera li seħħet l-esponiment tal-mudullun, meta dan ikun iġġustifikat u meta ma jkunx hemm dejta oħra dwar l-esponiment (ara l-paragrafu 44).

Preparazzjoni tal-mudullun u tal-kromożomi

Eżatt wara l-ewtanażja umanitarja, jittieħdu ċelloli tal-mudullun mill-femori jew mit-tibji tal-annimali, imbagħad dawn jiġu esposti għal soluzzjoni ipotonika u jiġu ffissati. Imbagħad iċ-ċelloli fil-metafażi jitferrxu fuq lametti u jiġu mlewnin billi jintużaw metodi stabbiliti (ara (3) (12)).

▼M7

Analiżi

Il-lametti kollha, inklużi dawk tal-kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati b'mod indipendenti qabel l-analiżi u għandhom jitqassmu b'mod aleatorju sabiex min jaqrahom ma jkunx jaf x'inhi l-kundizzjoni tat-trattament.

L-indiċi mitotiku għandu jiġi stabbilit bħala miżura ta' ċitotossiċita f'għall-inqas 1 000 ċellula għal kull annimal għal kull annimal trattat għall-annimali ttrattati (inklużi kontrolli pożittivi), mhux ittrattati jew l-annimali tal-kontroll negattiv tal-veikolu/solvent kollha.

Għandhom jiġu analizzati tal-inqas 200 metafaži għal kull annimal għal aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali, inklużi u eskluži distakki (6). Madankollu, jekk id-database storika tal-kontroll negattiv tindika li l-frekwenza medja ta' sfond ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali hija <1 % fil-laboratorju tal-ittestjar, għandu jiġi kkunsidrat l-ikklassifiar ta' ċelloli addizzjonali. Aberrazzjonijiet tat-tip kromatid u kromożomiku għandhom jiġu rreġistrati għalihom u jiġu kklassifikati skont is-sottotipi (ksur, skambji). Il-proċeduri li jintużaw fil-laboratorju għandhom jiżguraw li l-analiżi tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi ssir minn persuni mħarrġin sew fl-għoti ta' punteġġi u huma evalwati bejn il-pari, jekk xieraq. Fid-dawl tal-fatt li l-proċeduri ta' preparazzjoni tal-lametti spiss jirriżultaw fil-ksur ta' sehem mill-metafażijiet li jirriżulta fit-telf ta' kromożomi, iċ-ċelloli li jingħataw punteġġ għandu jkun fihom għadd ta' ċentromeri ta' mhux inqas minn $2n \pm 2$, fejn n hija n-numru aplojdi ta' kromożomi għal dik l-ispeċi.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

Dejta dwar l-annimali individwali għandha tiġi ppreżentata f'forma ta' tabelli. L-indiċi mitotiku, l-għadd ta' ċelloli tal-metafaži li ngħataw punteġġ, in-numru ta' aberrazzjonijiet għal kull ċellola fil-metafaži u l-perċentwal ta' ċelloli b'aberrazzjoni(jiet) kromożomika strutturali għandhom jiġu evalwati għal kull annimal. Għandhom jiġu elenkati t-tipi differenti ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali bl-għadd u l-frekwenzi tagħhom għal gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Id-distakki, kif ukoll iċ-ċelloli poliplojdi u ċ-ċelloli bi kromożomi endoreduplikati għandhom jiġu rreġistrati b'mod separat. Il-frekwenza tad-distakki tiġi rrapportata iżda, ġeneralment, ma tkunx inkluża fl-analiżi tal-frekwenza totali ta' aberrazzjonijiet strutturali. Jekk ma hemmx evidenza ta' differenza fir-rispons bejn is-sessi, id-dejta tista' tingħaqad f'daqqa għall-analiżi statistika. Għandha tiġi rrapportata dejta dwar it-tossiċità tal-annimali u s-sinjali kliniċi wkoll.

Kriterji ta' Aċċettabilità

Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabilità tat-test:

a) Huwa aċċettat li d-dejta tal-kontroll negattiv parallel tiżdied fid-database storika tal-kontroll tal-laboratorju (ara l-paragrafi 11-14);

b) Il-kontrolli pożittivi paralleli jew il-kontrolli tal-punteġġ għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fid-database storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafi 20-21);

c) Ġie analizzat in-numru xieraq ta' doži u ċelloli;

d) Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 25-28.

Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk:

▼M7

a) Tal-inqas wieħed mill-gruppi tat-trattament jesibixxi żieda statistikament sinifikanti fil-frekwenza taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali (eskluži distakki) meta mqabbel mal-kontroll negattiv parallel,

b) Din iż-żieda hija marbuta mad-doża tal-inqas f'mument tal-kampjunar wieħed meta tiġi evalwata b'test tat-tendenza xieraq, u

c) Kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson).

Jekk l-ogħla doża biss tiġi eżaminata f'mument tal-kampjunar partikolari, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk ikun hemm żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel u r-riżultati jaqgħu barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson). Ir-rakkomandazzjonijiet għall-metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (13). Meta ssir analiżi tar-rispons għad-doża, għandhom jiġu analizzati tal-inqas tliet gruppi tad-doża. It-testijiet statistiċi għandhom jużaw l-annimal bħala l-unità sperimentali. Ir-riżultati pożittivi fit-test għall-aberrazzjonijiet kromożomiċi jindikaw li s-sustanza kimika tat-test tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-mudullun tal-ispeċi ttestjata.

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali kollha eżaminati:

a) L-ebda wieħed mill-gruppi tat-trattament ma jesibixxi żieda statistikament sinifikanti fil-frekwenza taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali (eskluži distakki) meta mqabbel mal-kontroll negattiv parallel,

b) Ma hemm l-ebda żieda marbuta mad-doża fi kwalunkwe ħin tal-kampjunar meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

c) Ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson), u

d) Seħħ esponiment tal-mudullun għas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test.

Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (13). Evidenza ta' esponiment tal-mudullun għal sustanza kimika tat-test tista' tinkludi dipressjoni tal-indiċi mitotiku jew kejl tal-livelli ta' plażma jew tad-demm tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test. Fil-każ ta' amministrazzjoni fil-vina, ma hemmx bżonn ta' evidenza ta' esponiment. Inkella, tista' tintuża dejta ADME, miksuba fi studju indipendenti bl-użu tal-istess rotta u l-istess speċi, sabiex jintwera li seħħ esponiment tal-mudullun. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, fil-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza kimika tat-test ma tinduċix aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-mudullun tal-ispeċi ttestjata.

Ma hemm l-ebda ħtieġa għal verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar u sabiex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda batuta jew limitata), id-dejta għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri tal-esperimenti eżistenti mwettqin. F'ċerti każijiet, l-analiżi ta' iktar ċelloli jew it-twettiq ta' esperiment ripetut bl-użu ta' kundizzjonijiet modifikati tal-esperiment jistgħu jkunu siewja.

▼M7

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, id-dejta sejra tipprekludi konklużjoni li s-sustanza kimika tat-test tipproduċi riżultati pożittivi jew negattivi u, għalhekk, l-istudju jiġi konkluż bħala ekwivoku.

Il-frekwenzi ta' metafażijiet endoreduplikati u poliplojdi fost il-metafażijiet totali għandhom jiġu rreġistrati b'mod separat. Żieda fin-numru ta' ċelloli poliplojdi/endoreduplikati tista' tindika li s-sustanza kimika tat-test għandha l-potenzjal li tinibixxi l-proċessi mitotiċi jew il-progressjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 3).

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sommarju

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli

— l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

— is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

— il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-teħid man-nifs;

— id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż., l-istabilità, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

L-annimali tat-test:

— l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla;

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-metodu għall-identifikazzjoni unika tal-annimali;

— għal studji fuq terminu qasir: il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

▼M7

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-kontroll pożittiv u dak negattiv (veikolu/solvent);

— dejta minn studju għat-tiftix tal-medda, jekk ikun sar;

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— ir-raġuni għar-rotta u d-durata tal-għoti;

— metodi għall-verifika li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test laħqet iċ-ċirkulazzjoni ġenerali jew il-mudullun;

— id-doża propja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— il-metodu tal-ewtanażja;

— il-metodu tal-analġeżija (meta tintuża);

— deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet;

— il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti;

— il-metodi ta' kejl tat-tossiċità;

— l-identità tal-inibitur tal-metafażi, il-konċentrazzjoni, id-doża u l-ħin tal-għoti tiegħu qabel il-kampjunar;

— il-proċeduri għall-iżolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;

— il-kriterji għall-ikklassifikar tal-aberrazzjonijiet;

— in-numru ta' ċelloli fil-metafażi analizzati għal kull annimal u n-numru ta' ċelloli analizzati għad-determinazzjoni tal-indiċi mitotiku;

— il-kriterji għall-aċċettabilità tal-istudju;

— il-kriterji sabiex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew inkonklużivi.

Ir-riżultati:

— il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;

— l-indiċi mitotiku, mogħti b'mod separat għal kull annimal;

— it-tip u n-numru ta' aberrazzjonijiet u ta' ċelloli aberranti, mogħti b'mod separat għal kull annimal;

— in-numru totali ta' aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u d-devjazzjonijiet standard;

— in-numru ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u d-devjazzjonijiet standard;

— bidliet fil-plojdija, inklużi l-frekwenzi ta' ċelloli poliplojdi u/jew endoreduplikati;

▼M7

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;

— l-analiżijiet statistiċi u l-metodu applikat;

— dejta li ssostni l-fatt li seħħ l-esponiment tal-mudullun;

— dejta tal-kontroll negattiv parallel u tal-kontroll pożittiv bil-meded, il-medji u d-devjazzjonijiet standard;

— id-dejta storika tal-kontroll negattiv u pożittiv b'meded, medji u devjazzjonijiet standard, u limiti ta' kontroll ta' 95 % għad-distribuzzjoni, kif ukoll il-perjodu ta' żmien u n-numru ta' osservazzjonijiet;

— il-kriterji ssodisfati għal rispons pożittiv jew negattiv.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjoni.

Referenzi.

TAGĦRIF

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), "Cytogenetic Tests in Mammals", in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. *et al*. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) Richold, M. *et al*. (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(5) Tice, R.R. *et al*. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. *et al*. (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(9) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(10) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) Lovell, D.P. *et al*. (1989), "Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼**M7**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Anewplojdija: Kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew aktar, iżda mhux minn multipli tas-sett (jew settijiet) kollu ta' kromożomi (ara poliplojdija).

Ċentromeru: Reġjun(i) ta' kromożomu li miegħu huma assoċjati fibri rqaq waqt id-diviżjoni taċ-ċellola, li jippermettu l-moviment b'ċertu ordni ta' kromożomi sekondarji għall-poli ta' ċelloli sekondarji.

Sustanza kimika: sustanza jew taħlita.

Aberrazzjoni tat-tip tal-kromatidi: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-ġdid bejn kromatidi.

Aberrazzjoni tat-tip tal-kromożomi: Ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-ġdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

Endoreduplikazzjoni: Proċess li bih wara perjodu S tar-replikazzjoni tad-DNA, in-nukleu ma jidħolx f'mitożi iżda jibda perjodu S ieħor. Ir-riżultat huwa kromożomi b'4, 8, 16… il-kromatid.

Distakk: Leżjoni akromatika iżgħar mill-wisgħa ta' kromatid wieħed, u b'misallinjament minimu tal-kromatidi.

Indiċi mitotiku: Il-proporzjon bejn in-numru ta' ċelloli f'mitożi u n-numru totali ta' ċelloli f'popolazzjoni, li huwa kejl tal-istatus tal-proliferazzjoni ta' dik il-popolazzjoni taċ-ċelloli.

Aberrazzjoni numerika: Bidla fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristku normali ta' annimali użati (anewplojdija).

Poliplojdija: Aberrazzjoni kromożomika numerika li tinvolvi bidla fin-numru tas-sett sħiħ ta' kromożomi, għall-kuntrarju ta' bidla numerika fil-parti tas-sett ta' kromożomi (ara anewplojdija).

Aberrazzjoni kromożomika strutturali: Bidla fl-istruttura tal-kromożomi li wieħed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku tal-istadju metafażiku tad-diviżjoni taċ-ċelluoli, osservati bħala tħassir u biċċiet, bidliet minn ġewwa u bidliet bejniethom.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M7

Appendiċi 2

ID-DISINN FATTORJALI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TAD-DIFFERENZI FIS-SESSI FL-ASSAĠĠ *IN VIVO* TAL-ABERRAZZJONI KROMOŻOMIKA

Id-disinn fattorjali u l-analiżi tiegħu

F'dan id-disinn, jiġu ttestjati tal-inqas 5 irġiel u 5 nisa f'kull livell tal-konċentrazzjoni li jirriżultaw f'disinn li juża tal-inqas 40 annimal (20 raġel u 20 mara, flimkien ma' kontrolli pożittivi rilevanti).

Id-disinn, li huwa wieħed mill-iktar disinni fattorjali sempliċi, huwa ekwivalenti għal analiżi bidirezzjonali tal-varjanza bis-sess u l-livell ta' konċentrazzjoni li huma l-effetti ewlenin. Id-dejta tista' tiġi analizzata billi jintużaw pakketti ta' softwer statistiku standard bħal SPSS, SAS, STATA, Genstat kif ukoll bl-użu ta' R.

L-analiżi tagħmel partizzjoni tal-varjabbiltà fis-sett ta' dejta bejn is-sessi, bejn il-konċentrazzjonijiet u b'rabta mal-interazzjoni bejn is-sessi u l-konċentrazzjonijiet. Kull wieħed mit-termini jiġi ttestjat kontra stima tal-varjabbiltà bejn l-annimali rreplikati fi ħdan il-gruppi ta' annimali tal-istess sess bl-istess konċentrazzjoni. Id-dettalji sħaħ dwar il-metodoloġija sottostanti huma disponibbli f'ħafna kotba standard dwar l-istatistika (ara r-referenzi) u fil-faċilitajiet tal-għajnuna pprovduti mal-pakketti statistiċi.

L-analiżi tkompli billi ssir spezzjoni tat-terminu ta' interazzjoni sess x konċentrazzjoni fit-tabella ANOVA ([1]). Fin-nuqqas ta' terminu ta' interazzjoni sinifikanti, il-valuri kombinati bejn is-sessi jew fost il-livelli ta' konċentrazzjoni jipprovdu testijiet statistiċi validi bejn il-livelli bbażati fuq it-terminu tal-varjabbiltà tar-raggruppati fi ħdan il-grupp tal-ANOVA.

L-analiżi tkompli billi tagħmel partizzjoni bejn l-istima tal-varjabbiltà bejn il-konċentrazzjonijiet f'kuntrasti li jipprovdu għal test għal kuntrasti lineari u kwadratiċi tar-risponsi bejn il-livelli tal-konċentrazzjonijiet. Meta jkun hemm interazzjoni sinifikanti sess x konċentrazzjoni, tista' ssir partizzjoni ta' dan it-terminu f'kuntrasti ta' interazzjoni lineari x sess u kwadradiku x sess ukoll. Dawn it-termini jipprovdu testijiet ta' jekk ir-risponsi għall-konċentrazzjoni humiex paralleli għaż-żewġ sessi jew jekk hemmx rispons differenzjali bejn iż-żewġ sessi.

L-istima tal-varjabbiltà tal-miġburin fi ħdan il-grupp tista' tintuża sabiex tipprovdi testijiet bejn il-pari tad-differenza bejn il-medji. Dawn il-paraguni jistgħu jsiru bejn il-medji għaż-żewġ sessi u bejn il-medji għal-livell ta' konċentrazzjoni differenti bħal fil-każ tal-paraguni mal-livelli tal-kontroll negattiv. F'dawk il-każijiet li fihom ikun hemm interazzjoni sinifikanti, jistgħu jsiru paraguni bejn il-medji ta' konċentrazzjonijiet differenti fi ħdan sess jew bejn il-medji tas-sessi fl-istess konċentrazzjoni.

Referenzi

Hemm ħafna kotba dwar l-istatistika li jiddiskutu t-teorija, id-disinn, il-metodoloġija, l-analiżi u l-interpretazzjoni tad-disinni fattorjali li jvarjaw mill-iktar analiżijiet b'żewġ fatturi sempliċi sal-iktar forom kumplessi użati fil-metodoloġija dwar id-Disinn tal-Esperiment. Din li ġejja mhijiex lista eżawrjenti. Uħud mill-kotba jipprovdu eżempji maħdumin ta' disinni komparabbli, f'ċerti każijiet b'kodiċi għat-twettiq tal-analiżijiet bl-użu ta' diversi pakketti ta' softwer.

([1]) L-esperti tal-istatistika li jieħdu approċċ għall-immudellar bħal dak li juża Mudelli Lineari Ġenerali (GLMs) jistgħu jagħmlu l-analiżi b'mod differenti iżda paragunabbli iżda mhux bilfors iħaddmu t-tabella anova tradizzjonali, li tmur lura għal approċċi algoritmiċi tal-kalkolu tal-istatistiki żviluppati qabel il-miġja tal-kompjuters.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. TEST TAL-MIKRONUKLEU FL-ERITROĊITI MAMMIFERI

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 474 (2016) tal-OECD Huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Ġie żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (1).

It-test *in vivo* tal-mikronukleu tal-mammiferi huwa ta' rilevanza partikolari għall-valutazzjoni tal-ġenotossiċità għaliex, għad li jvarja bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetiċi u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-risponsi. Assaġġ *in vivo* huwa siewi wkoll sabiex tkun tista' ssir investigazzjoni ulterjuri tal-ġenotossiċità żvelata minn sistema *in vitro*.

It-test *in vivo* tal-mikronukleu tal-mammiferi jintuża għall-qbid ta' ħsara indotta mis-sustanza kimika tat-test fil-kromożomi jew l-apparat mitotiku tal-eritroblasti. It-test jevalwa l-formulazzjoni tal-mikronukleu fl-eritroċiti tal-kampjun jew fil-mudullun jew fiċ-ċelloli tad-demm periferali tal-annimali, normalment rodituri.

L-għan tat-test tal-mikronukleu huwa li jidentifika sustanzi kimiċi li jikkawżaw ħsara ċitoġenetika li tirriżulta fil-formazzjoni ta' mikronukleji li jkun fihom biċċiet ta' residwi ta' kromożomi jew kromożomi sħaħ.

Meta eritroblast tal-mudullun jiżviluppa f'eritroċita immatura (kultant imsejħa wkoll retikuloċita jew eritroċita polikromatika), in-nukleu ewlieni jiġi estruż; kwalunkwe mikronukleu li ġie fformat jista' jitħalla fiċ-ċitoplażma. Il-viżwalizzazzjoni jew id-detezzjoni tal-mikronukleji hija ffaċilitata f'dawn iċ-ċelloli għax ma għandhomx nukleu ewlieni. Żieda fil-frekwenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati f'annimali ttrattati hija indikazzjoni ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali jew numeriċi indotti.

Eritroċiti mikronukleati fformati ġodda jiġu identifikati u kkwantifikati bit-tilwin segwit minn punteġġar viżwali bl-użu ta' mikroskopju, jew b'analiżi awtomatizzata. L-għadd ta' biżżejjed eritroċiti immaturi fid-demm periferali jew fil-mudullun ta' annimali adulti huwa ffaċilitat ħafna bl-użu ta' pjattaforma tal-punteġġar awtomatizzata. Dawn il-pjattaformi huma alternattivi aċċettabbli għall-evalwazzjoni manwali (2). Studji komparattivi wrew li t-tali metodi, li jużaw standards tal-kalibraġġ xierqa, jistgħu jipprovdu riproduċibbilità u sensittività aħjar bejn il-laboratorji u fi ħdan il-laboratorji mill-ikklassifikar manwali bil-mikroskopju (3) (4). Sistemi awtomatizzati li jistgħu jkejlu l-frekwenzi tal-eritroċiti mikronukleati jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, ċitometri tal-fluss (5), pjattaformi tal-analiżi tal-immaġnijiet (6) (7), u ċitometri ta' skennjar bil-laser (8).

Għad li dan normalment ma jsirx bħala parti mit-test, il-frammenti tal-kromożomi jistgħu jiġu distinti minn kromożomi sħaħ permezz ta' għadd ta' kriterji. Dawn jinkludu l-identifikazzjoni tal-preżenza jew l-assenza ta' kinetoċoru jew DNA ċentrometriku, li t-tnejn li huma huma karatteristiċi ta' kromożomi intatti. L-assenza ta' kinetoċoru jew DNA ċentrometriku tindika li l-mikronukleu fih biss frammenti ta' kromożomi, filwaqt li l-preżenza tindika telf ta' kromożomi.

Id-definizzjonijiet tat-terminoloġija użata huma stabbiliti fl-Appendiċi 1.

▼M7

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

Il-mudullun ta' rodituri adulti żgħar huwa t-tessut fil-mira għal ħsara ġenetika fit-test peress li l-eritroċiti huma prodotti f'dan it-tessut. Il-kejl tal-mikronukleji f'eritroċiti immaturi fid-demm periferali huwa aċċettabbli fi speċijiet mammiferi oħrajn li għalihom intweriet sensittività adegwata għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jikkaġunaw aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali jew numeriċi f'dawn iċ-ċelloli (b'induzzjoni tal-mikronukleji f'eritroċiti immaturi) u ġiet ipprovduta ġustifikazzjoni xjentifika. Il-frekwenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati hija l-punt ta' tmiem ewlieni. Il-frekwenza tal-eritroċiti maturi li fihom mikronukleji fid-demm periferali tista' tintuża wkoll bħala punt ta' tmiem fi speċijiet mingħajr selezzjoni splenika b'saħħitha kontra ċelloli mikronukleati u meta l-annimali jiġu ttrattati kontinwament għal perjodu li jaqbeż it-tul tal-ħajja tal-eritroċita fl-ispeċijiet użati (eż. 4 ġimgħat jew iktar fil-ġurdien).

Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, mhumiex sejrin jilħqu t-tessut fil-mira, jaf ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

L-annimali huma esposti għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' rotta xierqa. Jekk jintuża l-mudullun, l-annimali jiġu ewtanazzati b'mod umanitarju f'ħin(ijiet) xieraq wara t-trattament, il-mudullun jiġi estratt, u jsiru l-preparazzjonijiet u t-tilwin (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Meta jintuża demm periferali, id-demm jinġabar f'ħinijiet xierqa wara t-trattament u jsiru l-preparazzjonijiet u t-tilwin (12) (16) (17) (18). Meta t-trattament jingħata b'mod akut, importanti li jingħażlu l-ħinijiet tal-ġbir tal-mudullun jew tad-demm li fihom tista' tiġi identifikata l-induzzjoni relatata mat-trattament ta' eritroċiti immaturi mikronukleati. Fil-każ ta' kampjunar tad-demm periferali, irid ikun għadda wkoll biżżejjed żmien sabiex dawn l-avvenimenti jidhru fid-demm li jiċċirkola. Il-preparati jiġu analizzati għall-preżenza ta' mikronukleji, jew b'viżwalizzazzjoni bl-użu ta' mikroskopju, analiżi tal-immaġnijiet, iċ-ċitometrija tal-fluss, jew b'ċitometrija ta' skennjar bil-laser.

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

Investigazzjonijiet tal-Profiċjenza

Sabiex jiġi stabbilit li hemm biżżejjed esperjenza fit-twettiq tal-assaġġ qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun wera li għandu l-ħila li jirriproduċi r-riżultati mistennijin mid-dejta ppubblikata (17) (19) (20) (21) (22) għall-frekwenzi tal-mikronukleu b'tal-inqas żewġ sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfin indotti minn doża baxxi ta' kontrolli pożittivi), bħal dawk elenkati fit-Tabella 1 u b'kontrolli tal-veikolu/solvent kompatibbli (ara l-paragrafu 26). Dawn l-esperimenti għandhom jużaw dożi li jagħtu żidiet riproduċibbli u relatati mad-doża u juru s-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test fit-tessut ta' interess (il-mudullun jew id-demm periferali) u jużaw il-metodu tal-punteġġ li sejjer jitħaddem fil-laboratorju. Dan ir-rekwiżit mhuwiex applikabbli għal laboratorji li għandhom esperjenza, jiġifieri li għandhom database storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 14-18.

Dejta Storika tal-Kontroll

Matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza, il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv, u

▼M7

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv.

Meta għall-ewwel tinkiseb id-dejta għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu konsistenti mad-dejta tal-kontroll ippubblikata, meta tkun teżisti. Peress li tiżdied iktar dejta sperimentali mad-distribuzzjoni storika tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni. Id-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju għandha tkun statistikament robusta sabiex tiġi żgurata l-ħila tal-laboratorju sabiex jivvaluta d-distribuzzjoni tad-dejta tal-kontroll negattiv tiegħu. It-tagħrif jissuġġerixxi li jista' jkun hemm bżonn ta' minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment ikun hemm tal-inqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (23)), sabiex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-dejta tagħhom, u sabiex juru li l-metodoloġija hija "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom. Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inklużjoni u l-esklużjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (24).

Meta l-laboratorju ma jagħmilx numru kbir biżżejjed ta' esperimenti sabiex jistabbilixxi distribuzzjoni statistikament robusta tal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 15) matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza (deskritti fil-paragrafu 13), jista' jiġi aċċettat li d-distribuzzjoni tinbena matul l-ewwel testijiet ta' rutina. Dan l-approċċ għandu jsegwi r-rakkomandazzjonijiet stipulati fit-tagħrif (24) u r-riżultati tal-kontroll negattiv miksubin f'dawn l-esperimenti għandhom jibqgħu konsistenti mad-dejta ppubblikata tal-kontroll negattiv.

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-impatt tagħha fuq kemm id-dejta li tirriżulta tibqa' konsistenti mad-database storika eżistenti tal-kontroll tal-laboratorju. Inkonsistenzi kbar biss għandhom jirriżultaw fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll, fejn il-ġudizzju tal-esperti jistabbilixxi li tvarja mid-distribuzzjoni ta' qabel (ara l-paragrafu 15). Matul l-istabbiliment mill-ġdid, jaf ma jkunx hemm bżonn ta' database sħiħa tal-kontroll negattiv sabiex ikun jista' jsir test propju, diment li l-laboratorju jkun jista' juri li l-valuri tal-kontroll negattiv parallel tiegħu jibqgħu konsistenti mad-database ta' qabel jew mad-dejta ppubblikata korrispondenti.

Id-dejta tal-kontroll negattiv għandha tikkonsisti fl-inċidenza eritroċiti immaturi mikronukleati f'kull annimal. Idealment, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju. Meta d-dejta tal-kontroll negattiv parallel toħroġ mil-limiti ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll diment li din id-dejta ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 15) u ebda evidenza ta' żball tekniku jew uman.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Għażla ta' speċi tal-annimali

Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali żgħar b'saħħithom. Jistgħu jintużaw ġrieden, firien jew speċijiet mammiferi xierqa oħrajn. Meta jintuża demm periferali, irid jiġi stabbilit li t-tneħħija splenika ta' ċelloli

▼M7

mikronukleati miċ-ċirkulazzjoni ma tqegħidx f'riskju d-detezzjoni ta' mikronukleji indotti fl-ispeċi magħżula. Dan intwera biċ-ċar għad-demm periferali tal-ġrieden u l-firien (2). Fir-rapport għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika meta jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex firien u ġrieden. Jekk jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex rodituri, huwa rakkomandat li l-kejl tal-mikronukleji indotti jiġi integrat f'test xieraq ieħor tat-tossiċità.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali

Għar-rodituri, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). Għad li, idealment, l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun tal-inqas 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Ir-rodituri għandhom jitrabbew fi gruppi żgħar (mhux iktar minn ħamsa f'gaġġa) tal-istess sess u grupp tat-trattament jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva, idealment f'gaġeġ solidi mal-art bl-arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom biss jekk dan ikollu ġustifikazzjoni xjentifika.

Preparazzjoni tal-annimali

Normalment jintużaw annimali adulti żgħar b'saħħithom (għal rodituri, idealment 6-10 ġimgħat fil-bidu tat-trattament, għad li jistgħu jiġu aċċettati annimali ftit ixjaħ ukoll), u dawn jiġu assenjati b'mod aleatorju għall-gruppi tal-kontroll u tat-trattament. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu umanitarju u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikroċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fil-widnejn jew fis-swaba') u jitħallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-inqas ħamest ijiem. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u s-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju ta' kull sess.

Preparazzjoni tad-doża

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi jew veikoli xierqa jew jitħalltu f'dieta jew ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponimenti bit-teħid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

Kundizzjonijiet tat-test

Solvent/veikolu

Is-solvent/veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli tad-doża użati, u ma għandux ikun kapaċi li joħloq reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħrajn li mhumiex magħrufin sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' dejta ta' referenza li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Huwa rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetilċelluloża, żejt taż-żebbuġa u żejt tal-qamħirrum. Fin-nuqqas ta' dejta storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huma indotti ebda mikronukleu u effett dannuż ieħor minn solvent/veikolu atipiku magħżul, għandu jsir studju inizjali sabiex tiġi stabbilita l-aċċettabbiltà tal-kontroll tas-solvent/veikolu.

▼M7

Kontrolli

Kontrolli pożittivi

Normalment għandu jkun inkluż grupp ta' annimali ttrattati b'sustanza kimika tal-kontroll pożittiv ma' kull test. Dan jista' jiġi rrinunzjat meta l-laboratorju tal-ittestjar ikollu profiċjenza murija fit-twettiq tat-test u jkun stabbilixxa medda storika tal-kontroll pożittiv. Meta ma jkunx hemm grupp tal-kontroll pożittiv parallel inkluż, il-kontrolli tal-punteġġ (lametti fissi u mhux imlewnin jew kampjuni ta' sospensjoni taċ-ċelloli, kif ikun xieraq għall-metodu tal-punteġġar) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Dawn jistgħu jinkisbu billi fil-punteġġar tal-istudju jiddaħħlu kampjuni ta' referenza xierqa li nkisbu u nħażnu minn esperiment tal-kontroll pożittiv separat imwettaq b'mod perjodiku (eż. kull 6-18-il xahar); pereżempju, matul l-ittestjar tal-profiċjenza u fuq bażi regolari wara, fejn ikun hemm bżonn.

Is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv għandhom jipproduċu b'mod affidabbli żieda identifikabbli fil-frekwenza tal-mikronukleji fuq il-livell spontanju. Meta ssir klassifikazzjoni manwali bil-mikroskopju, id-doża tal-kontroll pożittiv għandhom jingħażlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tal-kampjuni kodifikati lil min jaqrahom. Huwa aċċettabbli li l-kontroll pożittiv jingħata b'rotta differenti mis-sustanza kimika tat-test, bl-użu ta' skeda tat-trattament differenti, u li l-kampjunar iseħħ biss f'waqt partikolari biss. Barra minn dan, jista' jiġi kkunsidrat l-użu ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv relatati mal-klassi tas-sustanzi kimiċi, meta xieraq. Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv.

Tabella 1

Eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv.

Sustanzi Kimiċi u CASRN
Metansulfonat tal-etil [CASRN 62-50-0]
Metansulfonat tal-metil [CASRN 66-27-3]
Nitrosurea tal-etil [CASRN 759-73-9]
Mitomiċina C [CASRN 50-07-7]
Ċiklofosfamida (monoidrat) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Trietilenmelamina [CASRN 51-18-3]
Kolċisina [CASRN 64-86-8] jew Vinblastina [CASRN 865-21-4] — bħal anew-ġeni

Kontrolli negattivi

L-annimali tal-grupp tal-kontroll negattiv għandhom ikunu inklużi f'kull ħin tal-kampjunar u l-bqija jiġu mmaniġġjati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, ħlief li ma jirċivux trattament bis-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent/veikolu fl-għoti tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi dan is-solvent/il-veikolu. Madankollu, jekk jintwera li hemm varjabbiltà konsistenti bejn l-annimali u frekwenzi ta' ċelloli b'mikronukleji permezz ta' dejta storika tal-kontroll negattiv f'kull waqt tal-kampjunar għal-laboratorju tal-ittestjar, jaf ikun hemm bżonn ta' kampjunar wieħed biss għall-kontroll negattiv. Meta jintuża kampjunar wieħed għall-kontrolli negattivi, għandu jkun l-ewwel waqt tal-kampjun użat fl-istudju.

▼M7

Jekk jintuża demm periferali, kampjun ta' qabel it-trattament jista' jiġi aċċettat minflok kontroll negattiv parallel għal studji fuq terminu qasir meta d-dejta li tirriżulta tkun konsistenti mad-database storika tal-kontroll għal-laboratorju tal-ittestjar. Intwera li għall-firien, il-kampjunar ta' volumi żgħar (eż. taħt il-100 µl/jum) qabel it-trattament għandu impatt minimu fuq il-frekwenza tal-isfond tal-mikronukleji (25).

PROĊEDURA

In-numru u s-sess tal-annimali

B'mod ġenerali, ir-rispons tal-mikronukleu huwa simili bejn l-annimali rġiel u, għalhekk, ħafna mill-istudji jistgħu jsiru f'kull sess (26). Dejta li turi d-differenzi rilevanti bejn l-irġiel u n-nisa (eż. differenzi fit-tossiċità sistemika, il-metaboliżmu, il-bijodisponibilità, it-tossiċità tal-mudullun, eċċ. inkluż, eż. fi studju għat-tiftix tal-medda) tħeġġeġ l-użu taż-żewġ sessi. F'dan il-każ, jaf ikun xieraq li jsir studju fiż-żewġ sessi, eż. bħala parti minn studju ripetut tat-tossiċità tad-doża. Jaf ikun xieraq li jintuża d-disinn fattorjali f'każ li jintużaw iż-żewġ sessi. Dettalji dwar kif tiġi analizzata d-dejta bl-użu ta' dan id-disinn huma mogħtijin fl-Appendiċi 2.

Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju għandhom jiġu stabbiliti bil-għan li jiġu pprovduti tal-inqas 5 annimali analizzabbli ta' sess wieħed, jew ta' kull sess jekk jintużaw it-tnejn, għal kull grupp. Fejn l-esponiment uman għas-sustanzi kimiċi jista' jkun speċifiku għas-sess, bħal ma jseħħ pereżempju għal ċerti prodotti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq. Bħala gwida għal rekwiżiti tipiċi massimi tal-annimali, studju fil-mudullun imwettaq skont il-parametri stabbiliti fil-paragrafu 37 bi tliet gruppi tad-doża u kontrolli negattivi u pożittivi paralleli (kull grupp imsawwar minn ħames annimali ta' sess uniku), ikun jeħtieġ bejn 25 u 35 annimal.

Livelli tad-doża

Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda dejta xierqa diġà disponibbli sabiex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jrid jintuża fl-istudju ewlieni (27). L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala l-ogħla doża li sejra tiġi tollerata mingħajr evidenza ta' tossiċità li tillimita l-istudju, b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, billi tiġi indotta dipressjoni tal-piż tal-ġisem jew ċitotossiċità tas-sistema ematopoetika, iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigħ, tbatija jew diffikultà li jeħtieġu ewtanażja umanitarja (28)).

L-ogħla doża tista' tiġi identifikata wkoll bħala doża li tipproduċi tossiċità fil-mudullun (eż. tnaqqis fil-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali fil-mudullun jew id-demm periferali ta' iktar minn 50 %, iżda mhux għal inqas minn 20 % tal-valur tal-kontroll). Madankollu, meta jiġu analizzati ċ-ċelloli pożittivi għas-CD71 fiċ-ċirkulazzjoni tad-demm periferali (jiġifieri biċ-ċitometrija tal-fluss), din il-frazzjoni bikrija ħafna ta' eritroċiti immaturi twieġeb għall-isfidi tossiċi iktar malajr mill-koorti ikbar pożittiva għall-RNA ta' eritroċiti immaturi. Għaldaqstant, it-tossiċità ikbar tista' ssir evidenti f'disinni tal-esponiment akut li jeżaminaw il-frazzjoni ta' eritroċiti immaturi pożittivi għas-CD71 meta mqabbla ma' dawk li jidentifikaw eritroċiti immaturi fuq il-bażi tal-kontenut tal-RNA. Għal din ir-raġuni, meta l-esperimenti jużaw ħamest ijiem tat-trattament jew inqas, l-ogħla livell tad-doża għas-sustanzi kimiċi tat-test li jikkaġunaw tossiċità jista' jiġi definit bħala d-doża li tikkaġuna tnaqqis statistikament sinifikanti fil-proporzjon ta' eritroċiti immaturi pożittivi għas-D71 fost l-eritroċiti totali iżda mhux inqas minn 5 % tal-valur tal-kontroll (29).

▼M7

Sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni tal-proprjetajiet tossikokineticiċi, jew jinduċu proċessi ta' ditossifikazzjoni li jistgħu jwasslu għal tnaqqis fl-esponiment wara għoti fit-tul jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' ssettar tad-doża u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

Sabiex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju sħiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv u tal-inqas tliet livelli ta' doża ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda mhux ikbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċix tossiċità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-dejta eżistenti, l-ogħla doża għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew iktar għandha tkun ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum, jew għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' inqas minn 14-il jum, 2 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tossiċità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew ebda tossiċità. Meta tiġi osservata tossiċità tat-tessut fil-mira (il-mudullun) fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, huwa rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'dożi mhux tossiċi. Studji li jkollhom l-għan li jikkaratterizzaw iktar bis-sħiħ l-informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża jistgħu jeħtieġu gruppi tad-doża addizzjonali. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn rekwiżiti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw.

Test tal-limitu

Jekk l-esperimenti għat-tiftix tal-medda, jew dejta eżistenti minn razez ta' annimali relatati, jindikaw li reġim tat-trattament ta' tal-inqas id-doża limitu (deskritta hawn taħt) ma jipproduċi ebda effett tossiku osservabbli (inkluż ebda dipressjoni tal-proliferazzjoni tal-mudullun jew evidenza oħra ta' ċitotossiċità tat-tessut fil-mira), u jekk ma tkunx mistennija ġenotossiċità fuq il-bażi ta' studji *in vitro* tal-ġenotossiċità jew dejta minn sustanzi kimiċi relatati strutturalment, f'dak il-każ jaf ma jitqiesx neċessarju li jsir studju sħiħ li juża tliet livelli tad-doża, diment li jkun intwera li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tilħaq it-tessut fil-mira (il-mudullun). F'dawn il-każijiet, livell tad-doża wieħed, fid-doża limitu, jista' jkun biżżejjed. Meta l-għoti jsir għal 14-il jum jew iktar, id-doża limitu hija ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Għal perjodi ta' għoti ta' 14-il jum jew inqas, id-doża limitu hija ta' 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum.

Amministrazzjoni tad-doża

Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħażlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-teħid man-nifs, intratrakeali, jew b'impjant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħażel sabiex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Ġeneralment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li mhijiex rotta intiża ta' esponiment tal-bniedem, u għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew l-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wieħed, wieħed għandu joqgħod attent li l-ħin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u l-kampjunar ikun biżżejjed sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (ara l-paragrafi 37). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw massimu ta' 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ikbar minn dan għandu jkun iġġustifikat. Ħlief għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment jipproduċu effetti aggravati f'konċentrazzjonijiet ikbar, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandu jitnaqqas kemm jista' jkun billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni sabiex tiġi żgurata amministrazzjoni ta' volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

▼M7

Skeda tat-trattament

Idealment, isiru 2 trattamenti jew iktar, mogħtijin f'intervalli ta' 24 siegħa, speċjalment meta dan it-test jiġi integrat fi studji oħrajn dwar it-tossiċità. Inkella, jistgħu jingħataw trattamenti waħedhom, jekk ikunu ġġustifikati xjentifikament (eż. sustanzi kimiċi tat-test li jkunu magħrufin li jimblokkaw iċ-ċiklu taċ-ċelloli). Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw ukoll bħala doża maqsuma, jiġifieri żewġ trattamenti jew iktar fl-istess ġurnata separati b'mhux iktar minn sagħtejn jew tlieta) sabiex jiġi ffaċilitat l-għoti ta' volum kbir. F'dawn iċ-ċirkustanzi, jew meta s-sustanza kimika tat-test tingħata bit-teħid man-nifs, il-ħin tal-kampjunar għandu jiġi skedat fuq il-bażi tal-ħin tal-aħħar dożaġġ jew tmiem l-esponiment.

It-test jista' jsir fi ġrieden jew firien b'wieħed minn dawn it-tliet modi:

a. L-annimali jiġu ttrattati bis-sustanza kimika tat-test darba. Il-kampjuni tal-mudullun jittieħdu tal-inqas darbtejn (minn gruppi indipendenti ta' annimali), l-ewwel wieħed mhux qabel 24 siegħa wara t-trattament, iżda mhux wara 48 siegħa wara t-trattament b'intervall(i) xieraq bejn il-kampjuni, sakemm sustanza kimika tat-test ma tkunx magħrufa li għandha nofs ħajja partikolarment twila. L-użu ta' ħinijiet tat-teħid ta' kampjuni qabel 24 siegħa wara t-trattament għandu jkun iġġustifikat. Il-kampjuni ta' demm periferali jittieħdu għall-inqas darbtejn (mill-istess grupp ta' annimali), l-ewwel wieħed mhux qabel 36 siegħa wara t-trattament, b'intervall(i) xierqa wara t-teħid ta' l-ewwel kampjun, iżda mhux aktar minn 72 siegħa. Fl-ewwel ħin tal-kampjunar, il-gruppi kollha tad-doża għandhom jiġu ttrattati u jinġabru kampjuni għall-analiżi; madankollu, fil-ħin(ijiet) tal-kampjunar iktar tard, l-ogħla doża biss trid tingħata. Meta jiġi identifikat rispons pożittiv f'ħin tal-kampjun wieħed, ma jkunx hemm bżonn li jittieħdu iktar kampjuni sakemm ma jkunx hemm bżonn ta' informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża. Il-ħinijiet tal-ġbir deskritti huma konsegwenza tal-kinetika tal-feġġa u l-għibien tal-mikronukleji f'dawn iż-2 kompartimenti tat-tessut.

b. Jekk jintużaw 2 trattament kuljum (eż. żewġ trattamenti f'intervalli ta' 24 siegħa), għandhom jinġabru kampjuni darba bejn 18 u 24 siegħa wara l-aħħar trattament riward il-mudullun jew darba bejn 36 u 48 siegħa wara l-aħħar trattament rigward demm periferali (30). Il-ħinijiet tal-ġbir deskritti huma konsegwenza tal-kinetika tal-feġġa u l-għibien tal-mikronukleji f'dawn iż-2 kompartimenti tat-tessut.

c. Jekk jintużaw tliet trattamenti kuljum jew iktar (eż. tliet trattamenti jew iktar f'intervalli ta' madwar 24 siegħa), il-kampjuni tal-mudullun għandhom jinġabru mhux iktar minn 24 siegħa wara l-aħħar trattament u d-demm periferali għandu jinġabar mhux iktar tard minn 40 siegħa wara l-aħħar trattament (31). Din il-possibbiltà ta' trattament tħaddem taħlita tal-assaġġ kometa (eż. kampjunar 2-6 sigħat mill-aħħar trattament) mat-test tal-mikronukleji, u l-integrazzjoni tat-test tal-mikronukleji ma' studji tat-tossiċità b'doża ripetuta. Id-dejta akkumulata tissuġġerixxi li l-induzzjoni tal-mikronukleji tista' tiġi osservata matul dawn il-perjodi itwal ta' żmien meta jingħataw 3 dożi jew iktar (15).

Jistgħu jintużaw reġimi oħrajn tad-dożaġġ jew tal-kampjunar meta dawn ikunu rilevanti u xjentifikament iġġustifikati, u sabiex tiġi ffaċilitata l-integrazzjoni ma' testijiet oħrajn tat-tossiċità.

Osservazzjonijiet

Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-inqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrin jidhru l-iktar l-effetti antiċipati. Tal-inqas darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' dożaġġ, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju, tal-inqas darba fil-ġimgħa matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-faži tal-ewtanażja. Fi studji twal

▼M7

tal-inqas ġimgħa, il-kejliet tal-konsum tal-ikel għandhom isiru tal-inqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-inqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanazzati b'mod umanitarju qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (28). F'ċerti ċirkustanzi, it-temperatura tal-ġisem tal-annimali tista' tiġi ssorveljata, peress li ipertermja u ipotermja indotti mit-trattament ġew implikati fil-produzzjoni ta' riżultati spurji (32) (33) (34).

Esponiment tat-tessut fil-mira

Għandu jittieħed kampjun tad-demm f'ħin(ijiet) xieraq sabiex ikunu jistgħu jiġu mixtarra l-livelli ta' plażma tas-sustanzi kimiċi tat-test bil-għan li jintwera li seħħet l-esponiment tal-mudullun, meta dan ikun iġġustifikat u meta ma jkunx hemm dejta oħra dwar l-esponiment (ara l-paragrafu 48).

Preparazzjoni tal-mudullun / tad-demm

Normalment iċ-ċelloli tal-mudullun jinkisbu mill-femori jew mit-tibji tal-annimali, eżatt wara l-ewtanażja umanitarja. Spiss, iċ-ċelloli jitneħħew, jitħejjew u jitlewnu bl-użu tal-metodi stabbiliti. Jistgħu jinkisbu volumi żgħar ta' demm periferali, skont l-istandards adegwati dwar it-trattament xieraq tal-annimali, jew bl-użu ta' metodu li jippermetti li l-annimal tat-test jibqa' ħaj, bħall-fsad mill-vina tad-denb jew vina xierqa oħra, jew b'titqiba kardijaka jew kampjunar minn vina kbira fil-fażi tal-ewtanażja tal-annimal. Kemm għal eritroċiti miksubin mill-mudullun kif ukoll dawk mid-demm periferali, skont il-metodu ta' analiżi, iċ-ċelloli jista' jsirilhom tilwin sopravitali minnufih (16) (17) (18), isiru l-preparazzjonijiet tal-istrixxi li mbagħad jitlewnu għall-mikroskopju, jew inkella jiġu ffissati u jitlewnu kif xieraq għall-analiżi biċ-ċitometrija tal-fluss. L-użu ta' tilwin speċifiku tad-DNA [eż. oranġjo tal-akridina (35) jew Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)] jista' jelimina xi wħud mill-artifatti assoċjati mal-użu ta' tilwin mhux speċifiku għad-DNA. Dan il-vantaġġ ma jipprekludix l-użu ta' tilwin konvenzjonali (eż. Giemsa għall-analiżi bil-mikroskopju). Jistgħu jintużaw ukoll sistemi addizzjonali [eż. kolonni taċ-ċelluloża li jneħħu ċelloli nukleati (37) (38)] diment li jkun intwera li dawn is-sistemi huma kompatibbli mal-preparazzjoni tal-kampjun fil-laboratorju.

Meta dawn il-metodi jkunu applikabbli, jistgħu jintużaw antikorpi antikinetoċori (39), FISH b'sondi tad-DNA panċentromeriċi (40) jew tikkettar *in situ* mogħti primer bi primers speċifiċi għall-panċetromeri, flimkien mal-kontrotilwin xieraq tad-DNA (41), sabiex tiġi identifikata n-natura tal-mikronukleji (kromożoma/-framment kromożomika) sabiex jiġi stabbilit jekk il-mekkaniżmu tal-induzzjoni tal-mikronukleu huwiex dovut għal attività klastoġenika u/jew anewġenika. Jistgħu jintużaw metodi oħrajn għal divrenzjar bejn il-klastoġeni u l-anewġeni jekk ikun intwera li dawn huma effettivi.

Analiżi (manwali u awtomatizzata)

Il-lametti jew il-kampjuni għall-analiżi kollha, inklużi dawk tal-kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati b'mod indipendenti qabel kull xorta ta' analiżi u għandhom jitqassmu b'mod aleatorju sabiex min jaqrahom manwalment ma jkunx jaf x'inhi l-kundizzjoni tat-trattament; it-tali kodifikazzjoni mhijiex neċessarja meta jintużaw sistemi ta' klassifikazzjoni awtomatizzati li ma jeħtiġux spezzjoni viżwali u li ma jistgħux jiġu affettwati minn preġudizzju tal-operatur. Il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali (immaturi + maturi) tiġi stabbilita għal kull annimal billi jingħaddu għall-inqas 500 eritroċiti għall-mudullun u 2 000 eritroċiti għad-demm periferali (42). Għandu jingħata punteġġ lil mill-inqas 4 000 eritroċiti immaturi għall-inċidenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati (43). Jekk id-database storika tal-kontroll negattiv tindika li l-frekwenza medja ta' sfond ta' eritroċiti immaturi mikronukleati hija ta' < 0.1 % fil-laboratorju tal-ittestjar, għandu jiġi kkunsidrat l-għoti ta' punteġġ lil ċelloli addizzjonali. Meta jiġu analizzati l-kampjuni, il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi

▼M7

għall-eritroċiti totali fl-annimali tat-trattament ma għandux ikun inqas minn 20 % tal-proporzjon tal-kontroll tal-veikolu/solvent meta l-punteġġar isir bil-mikroskopju u mhux inqas minn madwar 5 % tal-proporzjon tal-kontroll tal-veikolu/-solvent meta l-punteġġar tal-eritroċiti immaturi tas-CD71+ isir b'metodi ċitometriċi (ara l-paragrafu 31) (29). Pereżempju, għal assaġġ tal-mudullun mogħti punteġġ bil-mikroskopju, jekk il-proporzjon tal-kontroll tal-eritroċiti immaturi fil-mudullun ikun ta' 50 %, il-limitu superjuri tat-tossiċità jkun 10 % eritroċiti immaturi.

Peress li l-milsa tal-firien taħtaf u teqred l-eritroċiti mikronukleati, sabiex tinżamm sensittività għolja tal-assaġġ meta jiġi analizzat id-demm periferali tal-firien, idealment l-analiżi tal-eritroċiti immaturi mikronukleati tiġi ristretta għall-iżgħar frazzjoni. Meta jintużaw metodi tal-analiżi awtomatizzati, dawn l-iktar eritroċiti immaturi jistgħu jiġu identifikati fuq il-bażi tal-kontenut għoli ta' RNA tagħhom, jew il-livell għoli ta' riċetturi tat-transferrina (CD71+) espress fuq il-wiċċ tagħhom (31). Madankollu, paragun dirett tal-metodi ta' tilwin differenti wera li jistgħu jinkisbu riżultati sodisfaċenti b'bosta metodi, inkluż it-tilwin konvenzjonali bl-oranġjo tal-akridina (3) (4).

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

Dejta dwar l-annimali individwali għandha tiġi ppreżentata f'forma ta' tabelli. Għal kull annimal li jiġi analizzat għandhom jiġu elenkati separatament in-numru ta' eritroċiti immaturi li jingħaddu, il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi mikronukleati, u n-numru ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali. Meta l-ġrieden jiġu ttrattati kontinwament għal 4 ġimgħat jew iktar, id-dejta dwar in-numru u l-proporzjon ta' eritroċiti maturi mikronukleati għandha tingħata wkoll jekk tinġabar. Għandha tiġi rrapportata dejta dwar it-tossiċità tal-annimali u s-sinjali kliniċi wkoll.

Kriterji ta' Aċċettabilità

Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabilità tat-test:

a. Huwa aċċettat li d-dejta tal-kontroll negattiv parallel tiżdied fid-database storika tal-kontroll tal-laboratorju (ara l-paragrafi 15-18).

b. Il-kontrolli pożittivi paralleli jew il-kontrolli tal-punteġġ għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fid-database storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv parallel (ara l-paragrafi 24-25).

c. Ġie analizzat in-numru xieraq ta' dożi u ċelloli;

d. Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 30-33.

Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk:

a. Tal-inqas wieħed mill-gruppi tat-trattament jesibixxi żieda statistikament sinifikanti fil-frekwenza eritroċiti immaturi mikronukleati meta mqabbel mal-kontroll negattiv parallel,

b. Din iż-żieda hija marbuta mad-doża tal-inqas f'mument tal-kampjunar wieħed meta tiġi evalwata b'test tat-tendenza xieraq, u

c. Kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson).

▼M7

Jekk l-ogħla doża biss tiġi eżaminata f'mument tal-kampjunar partikolari, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk ikun hemm żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel u r-riżultati jaqgħu barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson). Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (44) (45) (46) (47). Meta ssir analiżi tar-rispons għad-doża, għandhom jiġu analizzati tal-inqas tliet gruppi tad-doża. It-testijiet statistiċi għandhom jużaw l-annimal bħala l-unità sperimentali. Ir-riżultati pożittivi minn test mikronukleu jindikaw li sustanza kimika tat-test tinduċi mikronukleji li huma r-riżultat ta' ħsara fil-kromożomi jew ħsara fl-apparat mitotiku fl-eritroblasti tal-ispeċi tat-test. F'każ li fih ikun sar test sabiex jinqabdu ċentromeri fi ħdan mikronukleji, sustanza kimika tat-test li tipproduċi mikronukleji li fihom ċentromeri (DNA ċentromeriku jew kinetoċoru, li jindika telf ta' kromożoma sħiħa) hija evidenza li s-sustanza kimika tat-test hija anewġen.

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali kollha eżaminati:

a. L-ebda wieħed mill-gruppi tat-trattament ma jesibixxi żieda statistikament sinifikanti fil-frekwenza eritroċiti immaturi mikronukleati meta mqabbel mal-kontroll negattiv parallel,

b. Ma hemm l-ebda żieda marbuta mad-doża fi kwalunkwe ħin tal-kampjunar meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

c. Ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson), u

d. Seħħ esponiment tal-mudullun għas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test.

Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (44) (45) (46) (47). Evidenza ta' esponiment tal-mudullun għal sustanza kimika tat-test tista' tinkludi dipressjoni tal-proporzjon ta' eritroċiti immaturi għal maturi jew kejl tal-livelli ta' plażma jew tad-demm tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test. Fil-każ ta' għoti fil-vina, ma hemmx bżonn ta' evidenza tal-esponiment. Inkella, tista' tintuża dejta ADME, miksuba fi studju indipendenti bl-użu tal-istess rotta u l-istess speċi, sabiex jintwera li seħħ esponiment tal-mudullun. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, fil-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċix mikronukleji fl-eritroċiti immaturi tal-ispeċi tat-test.

Ma hemm l-ebda ħtieġa għal verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar u sabiex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda batuta jew limitata), id-dejta għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri tal-esperimenti eżistenti mwettqin. F'ċerti każijiet, l-analiżi ta' iktar ċelloli jew it-twettiq ta' esperiment ripetut bl-użu ta' kundizzjonijiet modifikati tal-esperiment jistgħu jkunu siewja.

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, id-dejta sejra tipprekludi konklużjoni li s-sustanza kimika tat-test tipproduċi riżultati pożittivi jew negattivi u, għalhekk, l-istudju jiġi konkluż bħala ekwivoku.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sommarju

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

▼M7

— l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

— is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

— il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-teħid man-nifs;

— id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż. l-istabilità, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

L-annimali tat-test:

— l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla;

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-metodu għall-identifikazzjoni unika tal-annimali;

— studji fuq terminu qasir: il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv (veikolu/solvent);

— dejta minn studju għat-tiftix tal-medda, jekk ikun sar;

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— ir-raġuni għar-rotta u d-durata tal-għoti;

— metodi għall-verifika li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test laħqet iċ-ċirkulazzjoni ġenerali jew it-tessut fil-mira;

▼**M7**

— id-doża propja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— il-metodu tal-ewtanażja;

— il-metodu tal-analġeżija (meta tintuża);

— deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall- għażliet;

— il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti;

— il-proċeduri għall-iżolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;

— il-metodi ta' kejl tat-tossiċità;

— kriterji għall-ikklassifikar tal-eritroċiti immaturi mikronukleati;

— in-numru ta' ċelloli analizzati għal kull annimal fid-determinazzjoni tal-frekwenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati u għad-determinazzjoni tal-proporzjon ta' eritroċiti immaturi għal maturi;

— il-kriterji għall-aċċettabilità tal-istudju;

— il-metodi, bħall-użu ta' antikorpi antikinetoċori jew sondi tad-DNA speċifiċi għaċ-ċentromeri, sabiex jiġi kkaratterizat jekk mikronukleu fihx kromożomi sħaħ jew frammentati, jekk applikabbli.

Ir-riżultati:

— il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;

— il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali;

— in-numru ta' eritroċiti immaturi mikronukleati, mogħti separatament għal kull annimal;

— id-devjazzjoni standard medja ± ta' eritroċiti immaturi mikronukleati għal kull grupp;

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;

— l-analiżijiet statistiċi u l-metodi applikati;

— dejta tal-kontroll negattiv u tal-kontroll pożittiv paralleli bil-meded, il-medji u d-devjazzjonijiet standard;

— id-dejta storika tal-kontroll negattiv u pożittiv b'meded, medji u devjazzjonijiet standard, u limiti ta' kontroll ta' 95 % għad-distribuzzjoni, kif ukoll il-perjodu ta' żmien u n-numru ta' punti ta' dejta;

— dejta li ssostni l-fatt li seħħ l-esponiment tal-mudullun;

— dejta ta' karatterizzazzjoni li tindika jekk mikronukleu fihx kromożomi sħaħ jew frammentati, jekk applikabbli;

— il-kriterji ssodisfati għal rispons pożittiv jew negattiv.

▼M7

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjoni.

Referenzi.

TAGĦRIF

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. *et al*. (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. *et al*. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.

(7) Asano, N. *et al*. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

(8) Styles, J.A. *et al*. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.

(11) Heddle, J.A. *et al*. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. *et al*. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. *et al*. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

▼**M7**

(14) MacGregor, J.T. *et al*. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. *et al*. (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513-522.

(16) Hayashi, M. *et al*. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/-Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45-50.

(21) Hayes, J. *et al*. (2009), The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419-424.

(22) Wakata, A. *et al*. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84-100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(25) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.

(26) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(27) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(28) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97-99.

(43) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (1989), "Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Ċentromeru: Reġjun(i) ta' kromożomu li miegħu huma assoċjati fibri rqaq waqt id-diviżjoni taċ-ċellola, li jippermettu l-moviment b'ċertu ordni ta' kromożomi sekondarji għall-poli ta' ċelloli sekondarji.

Sustanza kimika: sustanza jew taħlita.

Eritroblast: Stadju bikri fl-iżvilupp tal-eritroċita, li jiġi eżatt qabel l-eritroċita immatura, fejn iċ-ċellola jkun għad fiha nukleu.

Kinetoċoru: L-istruttura tal-proteini li tifforma fiċ-ċentromeru taċ-ċelloli ewkarjotiċi, li torbot il-kromożoma mal-polimeri mikrotubuli mill-magħżel mitotiku matul il-mitożi u mejożi u l-funzjonijiet matul id-diviżjoni taċ-ċelloli sabiex tissepara l-kromatidi aħwa.

Mikronukleji: Nukleji żgħar, separati minn u addizzjonali għan-nukleji prinċipali taċ-ċelloli, prodotti waqt it-telofaża ta' mitożi (mejożi) permezz ta' biċċiet ta' residwi ta' kromożomi jew kromożomi sħaħ.

Eritroċita normokromatika jew matura: Eritroċita matura għalkollox li tilfet l-RNA residwu li jifdal wara l-enukleazzjoni u/jew li tilfet markaturi taċ-ċelloli oħrajn b'ħajja qasira li normalment jgħibu wara l-enukleazzjoni malli sseħħ id-diviżjoni tal-eritroblast finali.

Eritroċita polikromatika jew immatura: Eritroċita fformata ġdida fi stadju intermedju tal-iżvilupp, li tlewwen kemm bil-komponenti blu kif ukoll ħomor tat-tilwin klassiku tad-demm bħall-Giemsa ta' Wright minħabba l-preżenza ta' RNA residwu fiċ-ċellola fformata ġdida. Ċelloli fformati ġodda bħal dawn huma bejn wieħed u ieħor l-istess bħal retikuloċiti, li huma viżwalizzati bl-użu ta' kulurant vitali li jikkaġuna l-RNA residwu sabiex jagħqad f'retikulu. Metodi oħrajn, inkluż it-tilwin monokromatiku tal-RNA b'kuluranti fluworexxenti jew tikkettar ta' markaturi tal-wiċċ b'ħajja qasira bħas-CD71 b'antikorpi fluworexxenti, saru jintużaw ta' spiss sabiex tiġi identifikata ċ-ċellola ħamra tad-demm ifformata ġdida. Eritroċiti polikromatiċi, retikuloċiti, u eritroċiti pożittivi għas-CD71 ilkoll huma eritroċiti immaturi, għad li kull waħda minnhom għandha distribuzzjoni tal-età kemxejn differenti.

Retikuloċita: Eritroċita fformata ġdida mlewna b'kulurant vitali li twassal sabiex l-RNA ċellolari residu jagħqad f'retikulu karatteristiku. Ir-retikuloċiti u l-eritroċiti polikromatiċi għandhom distribuzzjoni tal-età ċellolari simili.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M7

Appendiċi 2

ID-DISINN FATTORJALI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TAD-DIFFERENZI FIS-SESSI FL-ASSAĠĠ *IN VIVO* TAL-MIKRONUKLEU

Id-disinn fattorjali u l-analiżi tiegħu

F'dan id-disinn, jiġu ttestjati tal-inqas 5 irġiel u 5 nisa f'kull livell tal-konċentrazzjoni li jirriżultaw f'disinn li juża tal-inqas 40 annimal (20 raġel u 20 mara, flimkien ma' kontrolli pożittivi rilevanti).

Id-disinn, li huwa wieħed mill-iktar disinni fattorjali sempliċi, huwa ekwivalenti għal analiżi bidirezzjonali tal-varjanza bis-sess u l-livell ta' konċentrazzjoni li huma l-effetti ewlenin. Id-dejta tista' tiġi analizzata billi jintużaw pakketti ta' softwer statistiku standard bħal SPSS, SAS, STATA, Genstat kif ukoll bl-użu ta' R.

L-analiżi tagħmel partizzjoni tal-varjabbiltà fis-sett ta' dejta bejn is-sessi, bejn il-konċentrazzjonijiet u b'rabta mal-interazzjoni bejn is-sessi u l-konċentrazzjonijiet. Kull wieħed mit-termini jiġi ttestjat kontra stima tal-varjabbiltà bejn l-annimali rreplikati fi ħdan il-gruppi ta' annimali tal-istess sess bl-istess konċentrazzjoni. Id-dettalji sħaħ dwar il-metodoloġija sottostanti huma disponibbli f'ħafna kotba standard dwar l-istatistika (ara r-referenzi) u fil-faċilitajiet tal-għajnuna pprovduti mal-pakketti statistiċi.

L-analiżi tkompli billi ssir spezzjoni tat-terminu ta' interazzjoni sess x konċentrazzjoni fit-tabella ANOVA ([1]). Fin-nuqqas ta' terminu ta' interazzjoni sinifikanti, il-valuri kombinati bejn is-sessi jew fost il-livelli ta' konċentrazzjoni jipprovdu testijiet statistiċi validi bejn il-livelli bbażati fuq it-terminu tal-varjabbiltà tar-raggruppati fi ħdan il-grupp tal-ANOVA.

L-analiżi tkompli billi tagħmel partizzjoni bejn l-istima tal-varjabbiltà bejn il-konċentrazzjonijiet f'kuntrasti li jipprovdu għal test għal kuntrasti lineari u kwadratiċi tar-risponsi bejn il-livelli tal-konċentrazzjonijiet. Meta jkun hemm interazzjoni sinifikanti sess x konċentrazzjoni, tista' ssir partizzjoni ta' dan it-terminu f'kuntrasti ta' interazzjoni lineari x sess u kwadradiku x sess ukoll. Dawn it-termini jipprovdu testijiet ta' jekk ir-risponsi għall-konċentrazzjoni humiex paralleli għaż-żewġ sessi jew jekk hemmx rispons differenzjali bejn iż-żewġ sessi.

L-istima tal-varjabbiltà tal-miġburin fi ħdan il-grupp tista' tintuża sabiex tipprovdi testijiet bejn il-pari tad-differenza bejn il-medji. Dawn il-paraguni jistgħu jsiru bejn il-medji għaż-żewġ sessi u bejn il-medji għal-livelli ta' konċentrazzjoni differenti bħal fil-każ tal-paraguni mal-livelli tal-kontroll negattiv. F'dawk il-każijiet li fihom ikun hemm interazzjoni sinifikanti, jistgħu jsiru paraguni bejn il-medji ta' konċentrazzjonijiet differenti fi ħdan sess jew bejn il-medji tas-sessi fl-istess konċentrazzjoni.

Referenzi

Hemm ħafna kotba dwar l-istatistika li jiddiskutu t-teorija, id-disinn, il-metodoloġija, l-analiżi u l-interpretazzjoni tad-disinni fattorjali li jvarjaw mill-iktar analiżijiet b'żewġ fatturi sempliċi sal-iktar forom kumplessi użati fil-metodoloġija dwar id-"Disinn tal-Esperiment". Din li ġejja mhijiex lista eżawrjenti. Uħud mill-kotba jipprovdu eżempji maħdumin ta' disinni komparabbli, f'ċerti każijiet b'kodiċi għat-twettiq tal-analiżijiet bl-użu ta' diversi pakketti ta' softwer.

([1]) L-esperti tal-istatistika li jieħdu approċċ għall-immudellar bħal dak li juża Mudelli Lineari Ġenerali (GLMs) jistgħu jagħmlu l-analiżi b'mod differenti iżda paragunabbli iżda mhux bilfors inaddmu t-tabella ANOVA tradizzjonali, li tmur lura għal approċċi algoritmiċi tal-kalkolu tal-istatistiki żviluppati qabel il-miġja tal-kompjuters.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14. **MUTAĠENIĊITÀ -TEST TA' MUTAZZJONI RIVERSIVA TA' BATTERJI**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 471, Test ta' Mutazzjoni Riversiva ta' Batterji (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

It-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji juża aċidu amino li jeħtieġ kundizzjonijiet ta' *Salmonella typhimurium* u *Escherichia coli* biex jiġu żvelati mutazzjonijiet f'punti, li jinvolvu sostituzzjoni, żjieda jew tħassir ta' par wieħed jew aktar ta' bażijiet DNA (1) (2) (3). Il-prinċipju tat-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji huwa li jiskopri mutazzjonijiet li jirrivertu mutazzjonijiet preżenti fil-kundizzjonijiet tat-test u jirrestitwixxu l-kapaċità funzjonali tal-batterja biex tissintesizza aċidu amino essenzali. Il-batterji li jiġu lura jiġu skoperti mill-kapaċità tagħhom li jikbru fl-assenza ta' l-aċidu amino meħtieġ mill-kundizzjonijiet tal-ġenitur tat-test.

Mutazzjonijiet f'punti huma l-kawża ta' ħafna mard ġenetiku fil-bniedem u hemm xiehda sostanzjali li mutazzjonijiet f'punt f'onkoġeni u fil-ġeni ta' ċelluli somatiċi li jrażżnu t-tumuri huma involuti fil-formazzjoni ta' tumuri fil-bniedem u f'annimali ta' esperimenti. It-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji huwa rapidu, mhux għali u relattivament faċli biex jitwettaq. Ħafna mill-kundizzjonijiet tat-test għandhom diversi karatteristiċi li jagħmluhom aktar sensittivi għall-iskoperta ta' mutazzjonijiet inklużi sekwenzi DNA responsivi fis-siti ta' reversjoni, permeabilità miżjuda ta' Ċelloli għal molekuli kbar u l-eliminazzjoni ta' sistemi ta' riparazzjoni ta' DNA jew titjib ta' proċessi ta' riparazzjoni ta' DNA li huma suxxettibbli għall-iżbalji. L-ispeċifiċità tal-kundizzjonijiet tat-test jistgħu jipprovdu informazzjoni utli dwar it-tipi ta' mutazzjonijiet li huma kkaużati mill-aġenti ġenotossiċi. Bażi ta' informazzjoni kbira ħafna ta' riżultati għal varjetà wiesgħa ta' strutturi hija disponibbli għal testijiet ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji u ġew żviluppati metodoloġiji stabbiliti sew biex jittestjaw il-kimiċi b'karatteristiċi diversi fiżiko kimiċi, inklużi komposti li jiżvintaw.

Ara wkoll l-Introduzzjoni ġenerali Taqsima B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Test ta' mutazzjoni riversiva jew fi *Salmonella typhimurium* jew f'*Escherichia coli* jiżvela mutazzjoni f'amino aċidu li jeħtieġ karatteristika (histidine jew tryptophan, rispettivament) biex jipproduċi karatteristika indipendenti minn fornitura minn barra ta' aċidu amino.

Mutaġeni li jġibu s-sostituzzjoni ta' koppji ta' bażijiet huma aġenti li jikkawżaw bidla fil-bażi tad-DNA. F'test reversiv din il-bidla tista' tirrikorri fil-lok tal-mutazzjoni oriġinali, jew f'xi tieni lok fil-genome batteriku.

Mutaġeni li jġibu l-mutazzjoni tal-faża tal-qari huma aġenti li jikkawżaw iż-żieda jew ittħassir ta' pari ta' bażi waħda jew aktar fid-DNA, u b'hekk jibdlu l-faża tal-qari tar-RNA.

▼B

1.3. KONSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

It-test tal-mutazzjoni batterika reversiva jutilizza Ċelloli prokarijotiċi, li huma differenti minn Ċelloli tal-mammiferi fil-karatteristiċi bħal ma huma l-assorbiment, il-metaboliżmu, l-istruttura tal-kromożomi u l-proċessi ta' riparazzjoni tad-DNA. It-testijiet li jitwettqu *in vitro* ġeneralment jeħtieġu l-użu ta' għejun esoġenu għall-attivazzjoni metabolika. Sistemi ta' attivazzjoni metabolika *in vitro* ma jistgħux jissimulaw kompletament il-kundizzjonijiet *in vivo* fil-mammiferi. Għalhekk it-test ma jagħtix informazzjoni diretta fuq il-qawwa mutaġenika u karċinoġenika ta' sustanza fil-mammiferi.

It-test tal-mutazzjoni riversiva batterika normalment jintuża bħala l-ewwel pass għall-attività ġenolossika u, b'mod partikolari, għall-attività li toħloq mutazzjoni puntiformi. Informazzjoni estensiva wriet li ħafna kimiċi li huma posittivi f'dan it-test juru wkoll attività mutaġenika f'testijiet oħra. Hemm eżempji ta' aġenti mutaġeniċi li ma jiġux żvelati b'dan it-test; ir-raġunijiet għal dawn in-nuqqasijiet jistgħu jkunu attribwiti għan-natura speċifika tal-punt ta' laħħar żvelat, differenzi fl-attivazzjoni metabolika, jew differenzi fil-bijodisponibbilità. Minnaħa l-oħra, l-fatturi li jsaħħu s-sensitività tat-test tal-mutazzjoni riversiva batterika jistgħu jwasslu għal sopravalutazzjoni ta' l-attivita mutaġenika.

It-test tal-mutazzjoni riversiva batterika jista' ma jkunx xieraq għall-valutazzjoni ta' ċerti klassijiet ta' kimiċi, per eżempju komposti b'qawwa kbira batteriċida (eż. ċerti antibijotiċi) li dawk li huma maħsuba (jew huma magħrufa) li jiddisturbaw speċifikatament is-sitema ta' replika ta' Ċelloli fil-mammiferi (eż. inibituri tat-topojsomerasi u ċerti analogi nukleosidi). F'dawn il-każijiet jistgħu jkunu aktar xierqa testijiet fuq mutazzjoni fil-mammiferi.

Minkejja li ħafna mill-komposti li huma posittivi f'dan it-test huna karċinoġeni tal-mammiferi, il-korrelazzjoni mhijiex assoluta. Tiddependi fuq il-klassi tal-kimika u hemm karċinoġeni li ma jiġux żvelati b'dan it-test għax jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi oħra li mhumiex ġenotossiċi jew mekkaniżmi li ma jeżistux f'ċelluli batteriċi.

1.4. PRINĊIPJI TAL-METODU TAT-TEST

Is-sospensjonijiet taċ-Ċelloli batteriċi jiġu esposti għas-sustanza tat-test fil-presenza u fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġenea. Fil-metodu ta' inkorporazzjonmi fuq bażi, dawn is-sospensjonijiet jitħalltu ma' agar ta' kopertura u jitqiegħdu fuq il-bażi minnufih fuq medjum minimu. Fil-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni, it-taħlita tat-trattament tiġi inkubata u imbagħad imħallta ma' agar ta' kopertura qabel titqiegħed fuq bażi fuq medjum minimu. Għaż-żewġ metodi ta' teknika, wara jumejn ta' inkubazzjoni jew tlieta, jingħaddu l-kolonji revertanti u jiġu mqabbla man-numru ta' kolonji revertanti spontanji fuq il-bażijiet ta' kontroll tas-solvent.

Ġew deskritti ħafna proċeduri għat-twettiq tat-test tal-mutazzjoni riversiva batterika. Fost dawk li ġeneralment jintużaw hemm il-metodu ta' inkorporazzjoni fuq bażi (1) (2) (3) (4), il-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni (2) (3) (5) (6) (7) (8), il-metodu ta' fluttwazzjoni (9) (10), u l-metodu tas-sospensjoni (11). Ġew deskritti modifiki għall-ittestjar ta' gassijiet jew fwar (12).

▼B

Il-proċeduri deskritti fil-metodu jappartjenu primarjament għall-metodi ta' l-inkorporazzjoni fuq baži u ta' qabel l-inkubazzjoni. Kull wieħed minnhom huwa aċċettabbli biex isiru esperimenti kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha. Ċerti sustanzi jistgħu jiġu żvelati b'mod aktar effiċjenti meta jintuża l-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni. Dawn is-sustanzi jappartjenu għal klassijiet kimiċi li jinkludu nitrosamini alifatiċi short chain, metalli divalenti, aldejidi, komposti ta' koloranti ażo u dijażo, alkalojdi pirolliżidini, komposti allil u nitro komposti (3). Hu rikonoxxut ukoll li ċerti klassijiet ta' mutaġeni mhux dejjem jiġu żvelati meta jintużaw proċeduri standard bħal ma huma l-metodu ta' inkorporazzjoni fuq baži u l-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni. Dawn għandhom jitqiesu bħala "każijiet speċjali" hu huwa bil-qawwa rakkomandat li jintużaw proċeduri alternattivi biex jiġu żvelati. Il-"każijiet speċjali" li ġejjin jistgħu jiġu identifikati (flimkien ma' eżempji ta' proċeduri li jistgħu jintużaw biex jiġu żvelati): komposti ta' koloranti ażo u dijażo (3) (5) (6) (13), kimiċI ta' gasssijiet u fwar (12) (14) (15) (16) u glikosidi (17) (18). Kull devjazzjoni mill-proċedura standard teħtieġ li tkun ġustifikata xjentifikament.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.5.1. **Preparazzjonijiet**

1.5.1.1. *Batterja*

Kulturi friski ta' batterja għandhom jitħallew jiżviluppaw sal-faži esponenzali tardiva jew il-faži bikrija stazzjonarja ta' l-Iżvilupp (madwar 109 Ċelloli kull ml). Ma għandhomx jintużaw kulturi fil-faži stazzjonarja tardiva. Huwa essenzali li l-kulturi li jintużaw fl-esperiment ikun fihom titolu għoli ta' batterja vijabbli. It-titolu jista' jintwera jew mill-informazzjoni storika ta' kontroll fuq il-fażijiet ta' żvilupp, jew minn kull analiżi permezz tad-determinazzjoni ta' l-għadd ta' Ċelloli vijabbli bl-esperiment tal-baži.

It-temperatuta rakkomandata għall-inkubazzjoni hi ta' 37 °Ċ.

Għandhom jintużaw għallinqas ħames karatteristiċi ta' batterji. Dawn għandhom jinkludu erba' karatteristiċi ta' *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 jew TA97a jew TA97; TA98; u TA100) li ġew pruvati li huma ta' min wieħed jorbot fuqhom u responsivi għar-riproduzzjoni bejn laboratorji. Dawn l-erba' karatteristiċi *S. typhimurium* għandhom pari bażiċi GC fuq il-lok ta' reversjoni primarja u huwa magħruf li jistgħu ma jiżvelawx ċerti mutaġeni ossidanti, aġenti li jipprovokaw il-cross-linking u idrażini. Dawn is-sustanzi jistgħu jiġu żvelati bil-karatteristiċi ta' *E. coli* WP2 jew *S. typhimurium* TA102 (19) li jkollhom par ta' baži AT fil-lok primarju ta' reversjoni. Għalhekk it-tagħqid rakkomandat ta' karatteristiċi huwa:

— *S. typhimurium* TA1535, u

— *S. typhimurium* TA1537 jew TA97 jew TA97a, u

— *S. typhimurium* TA98, u

— *S. typhimurium* TA100, u

— *E. coli* WP2 uvrA, jew *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), jew *S. typhimurium* TA102.

Biex jiġu żvelati mutaġeni cross-linking jista' jkun preferibbli li wieħed jinkludi TA102 jew li tiżdied karatteristika ta' riparazzjoni tad-DNA ta' *E. coli* (eż. *E. coli* WP2 jew *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Għandhom jintużaw proċeduri stabbiliti għall-preparazzjoni ta' kulturi primarji, verifika ta' l-immarkar u l-ħażna. Għandha tintwera l-ħtieġa ta' l-amino aċidu għall-Iżvilupp għal kull kultura primarja ffriżata (istidina għal karatteristiċi ta' *S. typhimurium*, u triptofan għal karatteristiċi ta' *E. coli*). Karatteristiċi oħra fenotipiċi għandhom jiġu verifikati bl-istess mod, jiġifieri: il-presenza jew l-assenza ta' plasmidi tal-fattur R fejn ikun xieraq (jiġifieri r-resistenza għall-ampiċillina fil-karatteristiċi ta' TA98, TA100, u TA97a jew TA97, WP2 uvrA u WP2 uvrA (pKM101), u resistenza għall-ampiċillina + tetraċiklina fil-karatteristika TA 102); il-presenza ta' mutazzjonijiet karatteristiċi (jiġifieri mutazzjoni rfa mutation fi *S. typhimurium* permezz ta' senmsitività għal kristalvjola, u mutazzjoni uvrA fi *E. coli* jew mutazzjoni uvrB mutation fi *S. typhimurium*, permezz ta' sensitività għal dawl ultravjola) (2) (3). Il-karatteristiċi għandhom ukoll jipproduċu numru ta' bażijiet ta' kolonji revertanti spontanji fi ħdan il-meddiet ta' frekwenza mistennija mill-informazzjoni storika ta' kontroll tal-laboratorji u preferibbilment fil-medda msemmija fil-letteratura.

1.5.1.2. *Medjum*

Jintuża agar minimu xieraq (eż. li jkun fih medjum E minimu ta' Vogel-Bonner u glukożju), u agar ta' kopertura li jkun fih istidina u bijotin jew triptofan biex jippermetti ftit diviżjonijiet ta' Ċelloli (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Attivazzjoni metabolika*

Il-batterja għandha tiġi esposta għas-sustanza tat-test kemm fil-presenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika xierqa. Is-sistema li normalment l-aktar tintuża hija frazzjoni post mitokondrijali integrata ta' kofattur (S9) ippreparata mill-fwied ta' annimali gerriema trattata b'aġenti li jipprokuraw l-enżimi bħal ma huma l-Aroclor 1254 (1) (2) jew komposizzjoni ta' phenobarbitone u β-naphthoflavone (18) (20) (21). Il-frazzjoni post mitokondrijali normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet fil-medda minn 5 sa 30 % v/v fit-taħlita S9. L-għażla u l-kundizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika tista' tiddependi fuq il-klassi tal-kimika li tintuża. F'ċerti każijiet, jista' jkun xieraq li jintużaw aktar minn konċentrazzjoni waħda ta' frazzjon post mitokondrijali. Għal komposti ta' kolorantiażo u dijażo, jista' jkun aktar xieraq li tintuża sistema ta' attivazzjoni metabolika (6) (13).

1.5.1.4. *Sustanza/preparazzjoni tat-test*

Sustanzi solidi tat-test għandhom jiddewbu jew jiġu sospiżi f'solventi jew mezzi xierqa u dilwiti kif ikun xieraq qabel ma tiġi ttrattata l-batterja. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistemi tat-test u/jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda sakemm l-informazzjoni ta' l-istabbilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Ma għandhux jkun hemm suspett ta' reazzjoni kimika tas-solvent/mezz mas-sustanza tat-test u dan is-solvent/mezz għandu jkun kompatibbli mas-sopravvivenza tal-batterja u ma' l-attività S9 (22). Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompattibilità tagħhom. Huwa rakkomandat li kull fejn ikun possibbli għandu l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż. Meta jiġu ttestjati sustanzi li mhumiex stabbli fl-ilma, is-solventi organiċi li jintużaw ma għandux ikollhom ilma.

▼B

1.5.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.5.2.1. *Karatteristiċi tat-test (Ara 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni*

Fost il-kriterji li għandhom jitqiesu meta jiġi determinat l-ogħla ammont tas-sustanza tat-test li għandha tintuża hemm il-ċitotossiċità u s-solubbilità fit-taħlita ta' trattament finali.

Jista' jkun utli li jiġu stabbiliti t-tossiċità u l-insolubbilità f'esperiment preliminari. Iċ-ċitossiċità tista' tiġi żvelata b'riduzzjoni fl-għadd ta' konolonji revertanti, bid-dehra ta' żvilupp a normali tal-fond, jew bil-grad ta' sopravivenza tal-kulturi ttratati. Iċ-ċitossiċità ta' sustanza tista' tinbidel fil-preżenza ta' sistemi ta' attivazzjoni metabolika. L-insolubbilità għandha tiġi stmata bħala preċipitazzjoni fit-taħlita finali taħt il-kundizzjonijiet attwali tat-test u tkun evidenti għall-għajn mingħajr għanjuna.

Il-konċentrazzjoni massima rakkomandata għat-test għal sustanzi solubbli li mhumiex ċitotossiċi hija 5mg/bażi jew 5µl/bażi. Għal sustanzi li mhumiex ċitotossiċi u li ma jinħallux fuq 5mg/bażi jew 5 µl/bażi u waħda mill-konċentrazzjonijiet ittestjati jew aktar għandha tkun mhux solubbli fit-taħlita finali tat-trattament. Sustanzi tat-test li huma diġà ċitotossiċi taħt il-5mg/bażi jew 5 µl/bażi għandhom jiġu ttestjati sa konċentrazzjoni ċitotossika. Dak li jippreċipita ma għandux jiddisturba l-għadd.

Għandhom jintużaw għallinqas ħames konċentrazzjonijiet differenti analizzabbli tas-sustanza tat-test b'madwar intervalli ta' semi logarittmi (jiġifieri √10) bejn punti tat-test għal esperiment inizjali. Jistgħu ikunu xierqa intervalli iqsar meta jkun qed jiġi investigat rispons ta' konċentrazzjoni. Testjar għola mill-ċonċentrazzjoni ta' 5mg/bażi jew 5 µl/bażi jista' jiġi kkunsidrat meta ssir il-valutazzjoni ta' sustanzi li jkollhom ammonti sostanzjali ta' impuritajiet potenzalment mutaġeniċi.

1.5.2.3. *Kontrolli negattivi u pożittivi*

Kontrolli (solvent jew mezz) pożittivi u negattivi konkurrenti speċifiċi għall-kwalitajiet, kemm b'attivazzjoni metabolika jew mingħajr, għandhom jiġu inklużi f'kull eżami. Għandhom jintgħażlu konċentrazzjonijiet ta' kontrolli pożittivi li juru l-prestazzjoni effettiva ta' kull eżami.

Għal eżamijiet li jagħmlu użu minn sistema ta' attivazzjoni metabolika, is-sustanza (i) ta' referenza ta' kontoll pożittiv għandha(hom) tingħażel fuq bażi tat-tip tal-kwalitajiet ta' batterja użati.

Is-sustanzi li ġejjin huma eżemmpji ta' kontrolli pożittivi xierqa għal eżamijiet ta' attivazzjoni metabolika:

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
781-43-1	212-308-4	9,10- Dimetil-antraċena
57-97-6	200-359-5	7,12- Dimetilbenż(*a*)antraċena
50-32-8	200-028-5	Benzo(a)pirena
613-13-8	210-330-9	2-Amino-antraċena

▼B

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
50-18-0		Ċiklofosfamida
6055-19-2	200-015-4	Monoidrat taċ-ċiklofosfamida

Is-sustanza li ġejja hija kontroll pożittiv xieraq għall-metodu ta' attivazzjoni metabolika riduttiva:

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
573-58-0	209-358-4	Congo Red

It-2-Aminoantraċena ma għandhiex tintuża bħala l-uniku indikatur ta' l-effikaċja tat-taħlita S9. Jekk tintuża t-2-aminoantraċena, kull lott ta' S9 għandu jkun karatteriżat b'mutaġen li jeħtieġ l-attivazzjoni metabolika b'enżimi mikrosomali, eż. benzo(a)pirena, dimetilbenzantraċena.

Is-sustanzi li ġejjin huma eżempji ta' kontrolli pożittivi skond karatteristiċi speċifiċi għal eżamijiet imwettqa mingħajr is-sistema ta' attivazzjoni metabolika essoġena:

NRI CAS	NRI EINECS	ISMIJIET	Strain
26628-22-8	247-852-1	Ażidu tas-sodju	TA 1535 u TA 100
607-57-8	210-138-5	2 Mikro-fluworena	TA 98
90-45-9	201-995-6	9 Amino-akridina	TA 1537, TA 97 u TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 u TA 97a
80-15-9	201-254-7	Iperossidu tal-Kumena	TA 102
50-07-7	200-008-6	Mitomycin C	WP2 uvrA u TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-3-nitro-N-nitrosogwanidina	WP2, WP2uvrA u WP2uvrA (pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-Nitrokwinolina-1-ossidu	WP2, WP2uvrA u WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		Furilfuramida (AF2)	Karatteristiċi li fihom il-plasmid

Jistgħu jintużaw sustanzi ta' referenza ta' kontroll pożittiv xierqa oħra. Għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontroll pożittiv li huma relatati ma' klassijiet ta' kimiċi, meta dan ikun possibbli.

Għandhom jiġu inklużi kontrolli negattivi, li jikkonsistu biss f'solvent jew mezz, mingħajr sustanza tat-test, u mod ieħor ittrattati bl-istess mod bħal gruppi ta' trattament. B'żieda ma dan, għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakamm ma jkunx hemm informazzjoni storika ta' kontroll li turi li s-solvent magħżul ma jġibx effetti ta' ħsara jew mutaġeniċi.

▼B

1.5.3. **Proċedura**

Għall-metodu ta' inkorporazzjoni fuq baži (1) (2) (3) (4), mingħajr l-attivazzjoni metabolika, normalment 0,05 jew 0,1 ml tas-soluzzjonijiet tat-test, 0,1 ml ta' kulturi friski ta' batterja (li jkun fihom madwar 108 ċelloli vijabbli u 0,5 ml ta' tarka sterili jitħalltu ma' 2,0 ml ta' agar ta' kopertura. Għall-eżami bl-attivazzjoni metabolika, normalment 0,5 ml tat-taħlita ta' l-attivazzjoni metabolika li jkun fiha ammont adegwat ta' frazzjoni post mitokondrijali (fil-medda ta' 5 sa 30 % v/v fit-taħlita ta' l-attivazzjoni metabolika) jitħalltu ma' agar ta' kopertura (2,0 ml) flimkien mal-batterja u mas-sustanza tat-test/soluzzjoni tat-test. Il-kontenut ta' kull tubu jiġi mħallat u jitferra fuq superfiċi ta' baži b'agar minimu. L-agar ta' kopertura jitħalla jsir solidu qabel l-inkubazzjoni.

Għall-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni (2) (3) (5) (6), is-sutanza tat-test/soluzzjoni tat-test tiġi inkubata minn qabel mal-karatteristika tat-test (li jkun fiha madwar 108 Ċelloli vijabbli u t-tarka sterili jew is-sistema ta' attivazzjoni metabolika, 0,5ml) ġeneralment għal 20 minuta jew aktar f'temperatura ta' 30- 37Ċ qabel ma titħallat ma' l-agar ta' kopertura u titferra fuq superfiċi ta' baži ta' agar minimu. Ġeneralment 0,05 jew 0,1 ml tas-sustanza tat-test/soluzzjoni tat-test, 0,1 ml ta' batterja u 0,5ml ta' taħlita S9 jew tarka sterili jitħalltu ma' 2,0 ml ta' agar ta' kopertura. It-tubi għandhom jitħallew li tidħol l-arja fihom fl-istadju ta' qabel l-inkubazzjoni billi jintuża aġitatur.

Biex issir stima xierqa tal-varjazzjoni, għandhom jintużaw tarki ittriplikati għal kull livell ta' doża. L-użu ta' tarka duplikata hija aċċettabbli meta xjentement ġustifikata. It-telfa ta' kull tant ta' baži ma tinvalidax it-test neċessarjament.

Sustanzi gassużi jew volatili għandhom jiġu ttestjati b'metodi xierqa, bħalma huma mezzi magħluqa (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubazzjoni**

Il-bażijiet kollha f'eżami partikolari għandhom jiġu inkubati ta' 37 °C għal 48-72 siegħa. Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni, għandu jingħadd in-numru ta' kolonji revertanti kull baži.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Informazzjoni għandha tiġi preżentata bħala numru ta' kolonji revertanti kull baži. Għandu jingħata wkoll in-numru ta' kolonji revertanti kemm dwar bażijiet ta' kontroll negattivi (kontroll tas-solvent, u kontroll mhux trattat, jekk ikun ġie użat) kif ukoll bażijiet ta' kontroll pożittivi. L-għadd ta' bażijiet individwali, in-numru medju ta' kolonji revertanti kull baži u d-devjazzjoni standard għandhom jiġu preżentati għas-sustanza tat-test u għall-kontrolli pożittivi u negattivi (mhux trattati u/jew tas-solvent).

Ma hemmx ħtieġa ta' verifika għal rispons pożittiv ċar. Riżultati ambigwi għandhom jiġu ċċarati b'permezz ta' aktar testijiet preferibbilment billi jkun hemm modifika fil-kundizzjonijiet ta' l-esperiment. Riżultati negattivi għandhom jiġu konfermati fuq il-baži ta' każ b'każ. F'dawk il-każijiet fejn il-konferma ta' riżultati negattivi mhiex ikkunsidrata bħala negattiva, trid tingħata ġustifikazzjoni. Modifikazzjonijiet ta' parametri ta' studju sabiex tiġi estiża l-medda tal-kundizzjonijiet stmati għandha tiġi kkonsidrata f'esperimenti ta' wara. Parametri ta' studju li jisgħu jiġu modifikati jinkludu l-ispazjar tal-konċentrazzjoni, il-metodu ta' trattament (inkorporazzjoni mal-baži jew qabel l-inkubazzjoni fil-likwidu), u kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika.

▼B

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TA' RIŻULTATI

Hemm diversi kriterji sabiex jiġi determinat riżultat pożittiv, bħal żieda ta' relata mal-konċentrazzjoni matul il-medda ttestjata u/jew żieda riproduċibbli f'konċentrazzjoni waħda jew aktar fin-numru ta' kolonji revertanti kull bażi f'mill-inqas karatteristika waħda b'sistema ta' attivazzjoni metabolika jew mingħajrha (23). Għandha tiġi kunsidrata l-ewwel ir-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Jistgħu jintużaw metodi ta' statistika bħala għanjuna għal valutazzjoni tar-riżultati tat-test (24). Madankollu, is-sinjifikanza statistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal rispons pożittiv.

Sustanza ta' test li dwarha r-riżultati ma josservawx il-kriterji fuq imsemmija hija kkunsidrata bħala mhux mutaġenika f'dan it-test.

Minkejja li ħafna esperimenti jagħtu riżultati ċari, pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni mogħtija ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività tas-sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ambigwi jew dubbjuż rrispettivament min-numru ta' drabi li jiġi ripetut l-esperiment.

Riżultati pożittivi mit-test ta' mutazzjoni reversibbli batterika jindikaw li s-sustanza tiġġenera mutazzjonijiet mal-punt permezz ta' sostituzzjonijiet fuq il-bażi jew tibdiliet fil-parametri tal-ġenomu ta' jew *Salmonella typhimurium* u/jew *Escherichia coli*. Riżultati negattivi jindikaw li taħt il-kundizzjonijiet tat-test is-sustanza tat-test mhix mutaġenika fl-ispeċi ttestjati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/mezz;

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Karatteristiċi:

— Karatteristiċi użati;

— numru ta' ċelluli kull kultura;

— dettalji tal-karatteristiċi.

Kundizzjonijiet tat-Test:

— ammont tas-sustanza tat-test kull bażi (mg/bażi jew µl/bażi) flimkien mar-raġuni bażija għall-għażla tad-doża u n-numru ta' bażijiet kull konċentrazzjoni;

— medja użata;

— tip u komposizzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika, inklużi l-kriterji ta' aċċettazzjoni;

— proċeduri tat-trattament.

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità;

— sinjali ta' preċipitazzjoni;

— għadd ta' bażijiet individwali;

▼B

— in-numru medju ta' kolonji rivertanti kull baži u devjazzjoni standard;

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;

— analiżi statistiċi, jekk ikun hemm;

— informazzjoni dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, fl-istess ħin, bil-meded, mezzi, u devjazzjonjiet standard;

— informazzjoni dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, storiċi, bil-meded, mezzi, u devjazzjonjiet standard.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters 1, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. Food Safety, 8, pp. 167-177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutation Res., 38, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335-344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen., 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, Cancer Res., 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼M7

_____

_____

▼M8

B.17. TESTIJIET *IN VITRO* TAL-MUTAZZJONI ĠENETIKA FUQ ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI BL-UŻU TAL-ĠENI HPRT U XPRT

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 476 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu u tat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni riveduta kurrenti tat-TM B.17 tirrifletti kważi tletin sena esperjenza b'dan it-test u tirriżulta wkoll mill-iżvilupp ta' metodu ġdid separat dedikat għal testijiet *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi bl-użu tal-ġene tat-timidina kinaži. TM B.17 hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppat dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (1).

2. L-iskop tat-test *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi hu li jindividwa l-mutazzjonijiet ġenetiċi indotti mis-sustanzi kimiċi. Il-linji ta' ċelloli użati f'dawn it-testijiet ikejlu l-mutazzjonijiet 'il quddiem fil-ġeni indikaturi, speċifikament il-ġene endoġenu ipoksantina-gwanina fosforibożil trasferaži (Hprt f'ċelloli ta' rodituri, HPRT f'ċelloli umani; kollettivament imsejħa l-ġene Hprt u t-test HPRT f'dan il-metodu ta' ttestjar), u t-transġene ksantina-gwanina fosforibożil trasferaži (gpt) (imsejjaħ it-test XPRT). It-testijiet ta' mutazzjoni HPRT u XPRT jiżvelaw dehriet differenti ta' avvenimenti ġenetiċi. Minbarra l-avvenimenti mutazzjonali individwati mit-test HPRT (eż. sostituzzjonijiet tal-pari bażi, tibdil fil-qari ġenetiku, tħassiriet żgħar u inserzjonijiet) il-lokazzjoni awtosomali tat-transġene gpt tista' tippermetti l-iżvelar ta' mutazzjonijiet li jirriżultaw minn tħassiriet kbar u possibilment rikombinazzjoni mitotika mhux żvelata mit-test HPRT għaliex il-ġene Hprt jinsab fil-kromożoma X (2) (3) (4) (5) (6) (7). L-XPRT bħalissa jintuża anqas mit-test HPRT għal skopijiet regolatorji.

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. Ġeneralment it-testijiet imwettqa *in vitro* jeħtieġu l-użu ta' sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika. Is-sistema esoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*.

5. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati kundizzjonijiet li jkunu jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali, (jiġifieri interazzjonijiet possibbli mas-sistema tat-test), mhux ikkawżati minn interazzjoni diretta bejn is-sustanzi kimiċi tat-test u l-materjal ġenetiku taċ-ċellola; tali kundizzjonijiet jinkludu tibdiliet fil-pH jew fl-ożmolalità (8) (9) (10), interazzjoni mal-komponenti tal-medium (11) (12) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossiċità (13). Ċitotossiċità li taqbeż il-livelli massimi rakkomandati ta' ċitotossiċità kif definiti fil-paragrafu 19 titqies eċċessiva għat-test HPRT.

▼M8

6. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. Iċ-ċelloli mutanti nieqsa mill-attività tal-enzima Hprt fit-test HPRT jew mill-attività tal-enzima prt fit-test XPRT huma reżistenti għall-effetti ċitostatiċi tal-analogu tal-purina 6-tjogwanina (TG). Iċ-ċelloli profiċjenti fl-Hprt (fit-test HPRT) jew fil-gpt (fit-test XPRT) huma sensittivi għat-TG, li joħloq l-inibizzjoni tal-metaboliżmu ċellolari u jwaqqaf aktar diviżjoni fiċ-ċelloli. B'hekk, iċ-ċelloli mutanti jkunu jistgħu jipproliferaw fil-preżenza tat-TG, filwaqt li ċelloli normali, li fihom l-enzima Hprt (fit-test HPRT) jew gpt (fit-test XPRT) ma jkunux.

8. Ċelloli f'sospensjoni jew f'kolturi monosaff jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test, kemm b'sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr (ara l-paragrafu 14), għal perjodu xieraq ta' żmien (3-6 sigħat), u mbagħad jiġu subkolturati biex tiġi determinata ċ-ċitotossiċità u titħalla l-espressjoni fenotipika qabel l-għażla tal-mutant (14) (15) (16) (17). Iċ-ċitotossiċità tiġi determinata mis-sopravivenza relattiva (RS), jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni mkejla eżatt wara t-trattament u aġġustata għal kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-kontroll negattiv (paragrafu 18 u Appendiċi 2). Il-kolturi ttrattati jinżammu f'medium tat-tkabbir għal perjodu ta' żmien suffiċjenti, karatteristiku ta' kull tip ta' ċellola, biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutazzjonijiet indotti (tipikament minimu ta' 7-9 ijiem). Wara l-espressjoni fenotipika, il-frekwenza mutanti tiġi stabbilita biż-żriegħ ta' għadd magħruf ta' ċelloli f'medium li jkun fih l-aġent selettiv biex jiġu żvelati l-kolonji mutanti, u f'medium mingħajr aġent selettiv biex tiġi żvelata l-effiċjenza tal-klonazzjoni (vijabbiltà). Wara perjodu xieraq ta' inkubazzjoni, jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Ċelloli

9. It-tipi ta' ċelloli użati għat-testijiet HPRT u XPRT għandu jkollhom sensittività murija għal mutaġeni kimiċi, effiċjenza għolja tal-klonazzjoni, karjotip stabbli, u frekwenza mutanti spontanja stabbli. L-aktar ċelloli użati ta' spiss għat-test HPRT jinkludu l-linji CHO, CHL u V79 taċ-ċelloli tal-hamster Ċiniż, ċelloli tal-linfoma tal-ġrieden L5178Y, u ċelloli linfoblastojdi umani TK6 (18) (19). Għat-test XPRT jintużaw iċ-ċelloli AS52 derivati mis-CHO li fihom it-transġene gpt (u li jitħassrilhom il-ġene Hprt) (20) (21); it-test HPRT ma jistax isir f'ċelloli AS52 għaliex il-ġene hprt ikun tħassar. L-użu ta' linji ta' ċelloli ohra għandu jkun ġustifikat u validat.

10. Il-linji ta' ċelloli għandhom jiġu verifikati b'mod regolari għall-istabbiltà tal-għadd ta' kromożomi modali u l-assenza ta' kontaminazzjoni tal-Mikoplażma (22) (23), u ċ-ċelloli ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati jew jekk jinbidel l-għadd ta' kromożomi modali. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli użat fil-laboratorju tal-ittestjar għandu jkun stabbilit u konsistenti

▼M8

mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati. Il-frekwenza mutanti spontanja fiċ-ċelloli omm prinċipali għandha tiġi verifikat wkoll, u ċ-ċelloli omm ma għandhomx jintużaw jekk il-frekwenza mutanti ma tkunx aċċettabbli.

11. Qabel l-użu f'dan it-test, il-kolturi jaf ikollhom bżonn jitnaddfu miċ-ċelloli mutanti preeżistenti, eż. bil-kolturazzjoni f'medium HAT għat-test HPRT u MPA għat-test XPRT (5) (24) (Ara l-Appendiċi 1). Iċ-ċelloli mnaddfa jistgħu jiġu krijopreservati u mbagħad jinħallu biex jintużaw bħala ċelloli omm għall-użu. Iċ-ċelloli omm għall-użu li jkunu għadhom kif inħallew jistgħu jintużaw għat-test wara li jinkisbu ħinijiet normali tal-irdoppjar. Meta jsir it-test XPRT, il-koltura ta' rutina taċ-ċelloli AS52 għandha tuża kundizzjonijiet li jiżguraw iż-żamma tat-transġene gpt (20).

Kundizzjonijiet tal-media tal-koltura

12. Għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tat-tkabbir u tal-inkubazzjoni (reċipjenti tal-koltura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO2, u temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37 °C) għaż-żamma tal-kolturi. Il-kolturi taċ-ċelloli dejjem għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet li jiżguraw li jkunu qed jikbru fil-faża log. Hu partikolarment importanti li l-kundizzjonijiet tal-media u tal-kolturi jingħażlu ħekk li jiżguraw l-iżvilupp ottimali taċ-ċelloli matul il-perjodu ta' espressjoni u l-effiċjenza ottimali tal-klonazzjoni kemm għaċ-ċelluli mutanti kif ukoll għal dawk mhux mutanti.

Preparazzjoni tal-kolturi

13. Il-linji taċ-ċelloli huma propagati minn kolturi omm, miżrugħa fil-medium tat-tkabbir b'densità tali li ċ-ċelloli f'sospensjonijiet jew f'monosaffi jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali matul it-trattament u l-perjodi ta' espressjoni kollha kemm huma (eż. għandha tiġi evitata konfluwenza għal ċelloli li jikbru f'monosaffi).

Attivazzjoni metabolika

14. Għandhom jintużaw sistemi metabolizzanti esoġeni meta jintużaw ċelloli b'kapaċità metabolika endoġena inadegwata. L-aktar sistema użata spiss, li hi l-ewwel rakkomandata, sakemm ma jkunx ġustifikat mod ieħor, hi frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imħejjija mill-fwied ta' rodituri (ġeneralment firien) ittrattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) jew taħlita ta' fenobarbital u β-naftoflavon (29) (30) (31) (32). Din it-taħlita msemmija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes (33) u ntwera li hi effettiva daqs Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidażijiet b'funzjoni mħallta (29) (59) (31). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1 sa 2 % (v/v) iżda tista'tiżdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-għażla tat-tip u tal-konċentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena jew tal-induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi li jiġu ttestjati (34) (35) (36).

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

15. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 16). Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokolli standard, bħat-trattament f'reċipjenti tal-koltura ssiġillati (37) (38). Il-preparati tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin.

▼M8

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST

Solventi

16. Is-solvent għandu jingħażel biex tiġi ottimizzata s-solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test mingħajr ma jitħalla impatt avvers fuq it-twettiq tal-assaġġ, eż. tibdil fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-koltura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Hu rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tat-tkabbir). Pereżempju, fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma u s-sulfossidu tad-dimetil. Ġeneralment, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbżu l-1 % (v/v) u s-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbżu l-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk is-solventi użati ma jkunux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn *data* li tindika l-kompatibbiltà tagħhom mas-sustanzi kimiċi tat-test u mas-sistema tat-test, u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika bil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-*data ta'* sostenn, importanti li jiġu inklużi kontrolli mhux trattati (ara l-Appendiċi 1) biex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduċi ebda effett dannuż jew mutaġeniku.

Kejl taċ-ċitotossiċità u għażla tal-konċentrazzjonijiet tal-esponiment

17. Meta wieħed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva (ara l-paragrafu 20), il-preċipitazzjoni fil-medium tat-tkabbir (ara l-paragrafu 21), jew tibdiliet ċari fil-pH jew fl-ożmolalità (ara l-paragrafu 5). Jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tibdil ċar fil-pH tal-medium fi żmien iż-żieda, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali biex jiġu evitati riżultati pożittivi artefattwali u biex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-koltura.

18. L-għażla tal-konċentrazzjoni hi bbażata fuq iċ-ċitotossiċità u fuq kunsiderazzjonijiet oħra (ara l-paragrafi 20-22). Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità f'test inizjali tista' tkun siewja biex jiġu definiti aħjar il-konċentrazzjonijiet li jkunu se jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex meħtieġ. Anki jekk issir evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità inizjali, il-kejl taċ-ċitotossiċità għal kull koltura xorta waħda jkun meħtieġ fl-esperiment ewlieni. Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi evalwata bl-użu tal-RS, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament, fuq il-bażi tal-għadd taċ-ċelloli, meta mqabbla mal-aġġustament tal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

19. Għandhom jiġu evalwati tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inklużi l-kontrolli tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (iċ-ċitotossiċità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Filwaqt li l-użu ta' kolturi duplikati hu rakkomandat, jistgħu jintużaw kolturi repliki jew trattati individwalment f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Ir-riżultati miksuba fil-kolturi rreplikati indipendenti f'konċentrazzjoni partikolari għandhom jiġu rrapportati b'mod separat iżda jistgħu jiġu aggregati għall-analiżi tad-*data* (17). Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru tossiċità baxxa jew ebda tossiċità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-triplu normalment ikunu xierqa. Meta sseħħ ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin għandhom ikopru firxa minn dik iċ-ċitotossiċità produttiva sa konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossiċità moderata u baxxa jew ebda ċitotossiċità. Ħafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons weqfin u, biex tkun koperta l-medda sħiħa taċ-ċitotossiċità jew biex tiġi studjata r-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons fid-dettall, jaf ikun hemm

▼M8

bżonn li jintużaw konċentrazzjonijiet spazjati aktar qrib xulxin u aktar minn erba' konċentrazzjonijiet, speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 43). L-użu ta' aktar minn erba' konċentrazzjonijiet jista' jkun partikolarment importanti meta jintużaw kolturi individwali.

20. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilħaq bejn 20 u 10 % RS. Għandha tingħata attenzjoni meta jiġu interpretati riżultati pożittivi li jinsabu biss f'10 % RS jew anqas (il-paragrafu 43).

21. Għal sustanzi kimiċi tat-test ftit li xejn solubbli li mhumiex ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet anqas mill-anqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajnuna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossiċità sseħħ f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni waħda biss li tipproduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artefattwali mill-preċipitat. Fil-konċentrazzjoni li tipproduċi preċipitat, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekkilx it-twettiq tat-test. Id-determinazzjoni tas-solubbiltà fil-medium tat-tkabbir qabel l-esperiment tista' tkun utli.

22. Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossiċità li tillimita, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-anqas (39) (40). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa (jiġifieri Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli (UVCBs)) (41), estratti ambjentali, eċċ., il-konċentrazzjoni massima jaf ikollha bżonn tkun ogħla (eż. 5 mg/mL), fin-nuqqas ta' biżżejjed ċitotossiċità, biex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wieħed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (42).

Kontrolli

23. Għal kull kundizzjoni sperimentali għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 16) li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u mmaniġġjati bl-istess mod bħall-kolturi tat-trattament.

24. Kontrolli pożittivi konkorrenti huma meħtieġa biex juru l-ħila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' mutaġeni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat u l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena, meta applikabbli. Fit-tabella 1 ta' hawn taħt jingħataw xi eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll pożittiv oħra, jekk ikunu ġustifikati. Peress li t-testijiet *in vitro* fuq ċelloli tal-mammiferi għat-tossiċità ġenetika huma standardizzati biżżejjed, it-testijiet li jużaw trattament b'attivazzjoni metabolika esoġena u mingħajr jistgħu jitwettqu biss bl-użu ta' kontroll pożittiv li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. F'dan il-każ, dan ir-rispons tal-kontroll pożittiv individwali se juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll ir-risponsività tas-sistema tat-test. Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'konċentrazzjoni waħda jew aktar li tkun mistennija tagħti żidiet riproduċibbli u individwabbli li jispikkaw biex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test, u r-rispons ma għandux ikun imxekkel miċ-ċitotossiċità li taqbeż il-limiti speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar (ara l-paragrafu 20).

▼M8

Tabella 1

Sustanzi ta' riferiment rakkomandati għall-valutazzjoni tal-profiċjenza tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi

Kundizzjoni tal-Attivazzjoni Metabolika	Lokus	Sustanza u Nru CAS
Assenza ta' attivazzjoni metabolika esoġena	*Hprt*	Etilmetansulfonat [Nru CAS 62-50-0] Etilnitrosourea [Nru CAS 759-73-9] 4-Nitrokinolina 1-ossidu [Nru CAS 56-57-5]
	xprt	Streptonigrina [Nru CAS 3930-19-6] Mitomiċina C [Nru CAS 50-07-7]
Preżenza ta' attivazzjoni metabolika esoġena	*Hprt*	3-Metilkolantren [Nru CAS 56-49-5] 7,12-Dimetilbenżantraċen [Nru CAS 57-97-6] Benżo[a]piren [Nru CAS 50-32-8]
	xprt	Benżo[a]piren [Nru CAS 50-32-8]

PROĊEDURA

Trattament bis-sustanza kimika tat-test

25. Iċ-ċelloli li jipproliferaw huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika. L-esponiment għandu jkun għal perjodu xieraq ta' żmien (normalment perjodu ta' bejn tlieta u sitt sigħat ikun adegwat).

26. In-numru minimu ta' ċelloli użati għal kull koltura tat-test (tal-kontroll u trattata) f'kull stadju fit-test għandu jkun ibbażat fuq il-frekwenza mutanti spontanja. Gwida ġenerali hi li jiġu ttrattati u passaġġati biżżejjed ċelloli biex jinżammu 10 mutanti spontanji f'kull koltura fil-fażijiet kollha tat-test (17). Il-frekwenza mutanti spontanja ġeneralment tkun ta' bejn 5 u 20 × 10-6. Għal frekwenza mutanti spontanja ta' 5 × 10-6 u biex jinżamm numru suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) anki għall-kolturi ttrattati b'konċentrazzjonijiet li jikkawżaw ċitotossiċità ta' 90 % matul it-trattament (10 % RS), ikun hemm bżonn li tal-anqas jiġu ttrattati 20 × 106 ċelloli. Barra minn hekk, numru suffiċjenti ta' ċelloli (iżda qatt anqas minn żewġ miljuni) iridu jiġu kolturati matul il-perjodu ta' espressjoni u pjastrati għall-għażla tal-mutanti (17).

Il-ħin tal-espressjoni fenotipika u l-kejl tal-frekwenza tal-mutanti

27. Wara l-perjodu tat-trattament, iċ-ċelloli jiġu kkolturati biex tkun tista' ssir l-espressjoni tal-fenotip tal-mutanti. Ġeneralment ikun biżżejjed minimu ta' bejn sebgħa u disat ijiem biex tkun tista' ssir espressjoni fenotipika kważi ottimali ta' mutanti Hprt u xprt indotti ġodda (43) (44). Matul dan il-perjodu, iċ-ċelloli jiġu subkolturati regolarment biex jinżammu fi stat ta' tkabbir esponenzjali. Wara l-espressjoni fenotipika, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu pjastrati f'medium b'aġent selettiv (6-tiogwanina) u mingħajr għad-determinazzjoni tan-numru ta' mutanti u tal-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla, rispettivament. Dan il-pjastrament jista' jitwettaq bl-użu ta' platti għall-kolturi monosaffi jew ta' mikropjastri għaċ-ċelloli f'sospensjoni. Għall-għażla tal-mutanti, iċ-ċelloli għandhom jiġu pjastrati f'densità tali li tiżgura rkupru ottimali tal-mutanti (jiġifieri tiġi evitata kooperazzjoni metabolika) (17). Il-pjastri jiġu inkubati għal tul xieraq ta' żmien għat-tkabbir ottimali tal-kolonja (eż. 7-12-il jum) u jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).

▼M8

Proficjenza tal-laboratorju

28. Biex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza bit-test qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi pożittivi ta' riferiment li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti (tal-anqas waħda b'attivazzjoni metabolika u waħda mingħajr magħżula mis-sustanzi elenkati fit-Tabella 1) u diversi kontrolli negattivi (bl-użu ta' diversi solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontroll pożittiv u negattiv għandhom ikunu konsistenti mad-dokumentazzjoni. Dan mhuwiex applikabbli għal laboratorji li jkollhom esperjenza, jiġifieri li jkollhom bażi ta' *data* storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 30 sa 33.

29. Għażla ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv (ara t-Tabella 1 fil-paragrafu 25) għandha tiġi investigata fin-nuqqas u fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, biex tintwera l-proficjenza fl-iżvelar ta' sustanzi kimiċi mutaġeniċi, biex tiġi ddeterminata l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u biex tintwera l-adegwatezza tal-kundizzjonijiet tat-tkabbir taċ-ċelloli matul it-trattament, l-espressjoni fenotipika u l-għażla tal-mutanti u tal-proċeduri tal-għoti ta' punteġġ. Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi magħżulin biex jingħataw żidiet riproduċibbli u marbutin mal-konċentrazzjoni li jispikkaw biex jintwerew is-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test.

Data storika tal-kontroll

30. Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv,

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv (mhux trattat, solvent).

31. Meta għall-ewwel tinkiseb id-*data* għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu konsistenti mad-*data* tal-kontroll ippubblikata (22). Peress li tiżdied aktar *data* sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (17) (45) (46).

32. Il-bażi ta' *data* storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-anqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (47)), biex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u biex juru li l-metodoloġija hi "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (46). Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-*data* storika (jiġifieri kriterji għall-inklużjoni u l-esklużjoni ta' *data* fid-*data* storika u l-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (45).

33. Id-*data* ta' kontroll negattiv għandha tikkonsisti fi frekwenzi mutanti minn kolturi individwali jew idealment irreplikati kif deskritt fil-paragrafu 23. Idealment, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (17) (45) (46). Meta d-*data* tal-kontroll negattiv konkorrenti toħroġ mil-limitu ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll dment li din id-*data* ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara aktar 'il fuq) u jkun hemm evidenza ta' ebda żball tekniku jew uman.

▼M8

34. Kwalunkwe tibdil fil-protokoll tal-esperimenti għandu jiġi kkunsidrat fid-dawl tal-konsistenza tiegħu mal-bażijiet ta' *data* tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' bażi ta' *data* storika ġdida tal-kontroll.

DATA U RAPPORTAR

Preżentazzjoni tar-riżultati

35. Il-preżentazzjoni tar-riżultati għandha tinkludi d-*data* kollha meħtieġa biex tiġi kkalkolata ċ-ċitotossiċità (espressa bħala RS). Id-*data*, kemm għal kolturi ttrattati kif ukoll għal dawk tal-kontroll, għandha tinkludi n-numru ta' ċelloli fi tmiem it-trattament, in-numru ta' ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, u l-għadd tal-kolonji (jew in-numru ta' bwejriet mingħajr kolonji għall-metodu tal-mikropjastri). L-RS għal kull koltura għandha tkun espressa bħala perċentwal relattiv għall-kontroll tas-solvent konkorrenti (irreferi għall-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

36. Il-preżentazzjoni tar-riżultati għandha tinkludi wkoll id-*data* kollha meħtieġa biex tiġi kkalkolata l-frekwenza mutanti. Id-*data* għall-kolturi ttrattati kif ukoll tal-kontroll għandha tinkludi: (1) in-numru ta' ċelloli pjastrati b'aġent selettiv u mingħajr (fil-mument li fih iċ-ċelloli jiġu pjastrati għall-għażla tal-mutanti), u (2) in-numru ta' kolonji magħduda (jew in-numru ta' bwejriet mingħajr kolonji għall-metodu tal-mikropjastri) mill-pjastri b'aġent selettiv u mingħajr. Il-frekwenza mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti (fil-pjastri b'aġent selettiv) ikkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni (mill-pjastri mingħajr aġent selettiv). Il-frekwenza mutanti għandha tiġi espressa bħala n-numru ta' ċelloli mutanti għal kull miljun ċellola vijabbli (irreferi għall-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

37. Għandha tiġi pprovduta *data* dwar il-koltura individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tinġabar taħt forma ta' tabella.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

38. L-aċċettazzjoni ta' test hi bbażata fuq il-kriterji li ġejjin:

— Il-kontroll negattiv konkorrenti jitqies aċċettabbli għaż-żieda fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 33.

— Il-kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 24) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv konkorrenti.

— Ġew ittestjati żewġ kundizzjonijiet sperimentali (jiġifieri b'attivazzjoni metabolika u mingħajr) sakemm wieħed ma jirriżultax f'riżultati pożittivi (ara l-paragrafu 25).

— Hemm numru adegwat ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet li huma analizzabbli (paragrafi 25, 26 u 19).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 20, 21 u 22.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

39. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva biċ-ċar jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati:

▼M8

— tal-anqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,

— iż-żieda hi relatata mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 33).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi mutazzjonijiet ġenetiċi f'ċelloli kolturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (46) (48).

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali kollha eżaminati:

— l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,

— ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

— ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 33).

Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet ġentiċi f'ċelloli kolturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test.

41. Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

42. F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq jew biex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-*data* għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. It-twettiq ta' speriment ripetut, possibilment bl-użu ta' kundizzjonijiet sperimentali modifikati (eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet, kundizzjonijiet oħra tal-attivazzjoni metabolika [jiġifieri konċentrazzjoni S9 jew oriġini S9]) jista' jkun siewi.

43. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi. Għaldaqstant, ir-rispons tas-sustanza kimika tat-test għandu jiġi konkluż bħala ekwivoku (interpretat bħala bl-istess probabbiltà li jkun pożittiv jew negattiv).

Rapport tat-test

44. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

▼**M8**

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Is-solvent:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;

— il-perċentwal ta' solvent fil-medium tat-tkabbir finali.

Iċ-ċelloli:

Għal kolturi prinċipali tal-Laboratorju:

— it-tip, is-sors tal-linji ta' ċelloli;

— in-numru ta' passaġġi, jekk disponibbli, u l-istorja fil-laboratorju;

— il-karatteristiċi tal-karjotip u/jew in-numru modali tal-kromożomi;

— il-metodi għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli;

— l-assenza tal-mikoplażma;

— il-ħinijiet għall-irdoppjar taċ-ċelloli.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġuni prinċipali għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u l-għadd ta' kolturi inklużi, eż. *data* dwar iċ-ċitotossiċità u limitazzjonijiet tas-solubbiltà;

— il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni ta' CO_2, il-livell ta' umdità;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tat-tkabbir (eż. μg jew mg/ml jew mM tal-medium tat-tkabbir);

— il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) ta' solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tat-tkabbir;

— it-temperatura ta' inkubazzjoni;

— il-ħin ta' inkubazzjoni;

— id-durata tat-trattament;

— id-densità taċ-ċellula waqt it-trattament;

— it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-taħlita ta' S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' taħlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tat-tkabbir finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9);

— is-sustanzi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali għal kull kundizzjoni tat-trattament;

▼**M8**

— it-tul tal-perjodu ta' espressjoni (inkluż in-numru ta' ċelluli miżrugħa, u skedi ta' subkolturi u ta' tagħlif, jekk ikun xieraq);

— l-identità tal-aġent selettiv u l-konċentrazzjoni tiegħu;

— il-kriterji għall-aċċettabbiltà tat-testijiet;

— il-metodi użati biex jingħadd in-numru ta' ċelloli vijabbli u mutanti;

— il-metodi użati għall-kejl taċ-ċitotossiċità;

— kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossiċità u l-metodu użat;

— id-durata tal-ħinijiet ta' inkubazzjoni wara l-pjastrament;

— il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

— il-metodi użati biex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità u l-preċipitazzjoni.

Ir-riżultati:

— in-numru ta' ċelloli ttrattati u n-numru ta' ċelloli subkolturati għal kull koltura;

— il-kejlijiet taċ-ċitotossiċità u osservazzjonijiet oħra, jekk ikun hemm;

— is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-ħin tad-determinazzjoni;

— in-numru ta' ċelloli pjastrati f'medium selettiv u mhux selettiv;

— in-numru ta' kolonji f'medium mhux selettiv u n-numru ta' kolonji reżistenti f'medium selettiv, u l-frekwenzi mutanti relatati;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— id-*data* tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) konkorrenti;

— id-*data* storika tal-kontroll pożittiv u negattiv (solvent), bil-meded, bil-medji u bid-dejvazzjonijiet standard u bl-intervall ta' kunfidenza (eż. 95 %) kif ukoll bin-numru tad-*data*;

— analiżijiet statistiċi (għal kolturi individwali u għal repliki raggruppati jekk xieraq), u l-valuri p jekk ikun hemm.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariġi.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. u Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. u Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Acad. Sci. Sci., L-Istati Uniti, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. u Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. u Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, Mutation Res. Mutation Res.,223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. u Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res. Mutation Res.,312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. u Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. u Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. u Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. u Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. u Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., u Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. u Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. u Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. u Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. u Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., u Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., u Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., u Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Il-manuskritt għadu qed jitħejja).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. u Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. u Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. u de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. u Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. u Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. u Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. u Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. u Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Fi: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. u Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. u Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. u Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Il-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes, Programm tan-Nazzjonijiet Uniti għall-Ambjent (UNEP). Disponibbli fuq: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. u Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethyl-nitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. u McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Fi: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91–103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. u Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Linji Gwida tat-Test 473, 476 u 487). Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi.

(40) Brookmire L., Chen J.J. u Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Disponibbli fuq: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. u Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., u Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., u Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., u Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., u Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Mutaġeni li jissostitwixxu l-koppji tal-bażijiet: sustanzi kimiċi li jikkawżaw sostituzzjoni tal-koppji tal-bażijiet fid-DNA.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Effiċjenza tal-klonazzjoni: Il-perċentwal ta' ċelloli pjastrati f'densità baxxa li kapaċi jikbru f'kolonja li tista' tingħadd.

Konċentrazzjonijiet: irreferi għall-konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tat-tkabbir

Ċitotossiċità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar, iċ-ċitotossiċità hi identifikata bħala tnaqqis fis-sopravivenza relattiva taċ-ċelloli ttrattati meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu speċifiku).

Mutazzjoni 'l quddiem: mutazzjoni ta' ġene mit-tip parentali għall-forma mutanti li tkun toħloq alterazzjoni jew telf tal-attività enzimatika jew tal-funzjoni tal-proteina kodifikata.

Mutaġeni li jibdlu l-qari tal-kodiċi ġenetiku: sustanzi kimiċi li jikkawżaw iż-żieda jew it-tħassir ta' koppji tal-bażijiet individwali jew multipli fil-molekula tad-DNA.

Ġenotossiċi: terminu ġenerali li jinkludi kull tip ta' ħsara fid-DNA jew kromożomika, inkluż ksur tad-DNA, addotti, riarranġamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew fi ħsara kromożomika stabbli.

Medium tal-HAT: medium li fih l-Ipoksantina, l-Aminopterina u t-Timidina, użat għat-tindif tal-mutanti Hprt.

Rikombinament mitotiku: matul il-mitoży, ir-rikombinament bejn kromatidi omologi li possibilment jirriżulta fl-induzzjoni ta' ksur tal-ħajta doppja tad-DNA jew f'telf ta' eterożigożità.

Medium tal-MPA:: medium li fih il-Ksantina, l-Adenina, it-Timidina, l-Aminopterina u l-aċidu Mikofenoliku, użat għat-tindif tal-mutanti Xprt.

Mutaġeniċi: jipproduċu tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA fil-ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Frekwenza mutanti (MF): in-numru ta' kolonji mutanti osservati diviż bin-numru ta' ċelloli pjastrati f'medium selettiv, ikkoreġut għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (jew il-vijabbiltà) fil-mument tal-għażla.

Ħin tal-espressjoni fenotipika: Il-ħin wara t-trattament li matulu l-alterazzjoni ġenetika tkun fissa fi ħdan il-ġenom u kwalunkwe prodott tal-ġeni preeżistenti jitbattal sal-punt li l-karatteristika fenotipika tinbidel.

Sopravivenza relattiva (RS): RS tintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossiċità relatata mat-trattament. RS hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %).

Frazzjoni tal-fwied S9: supernatant ta' omoġenat tal-fwied wara ċentrifugazzjoni ta' 9 000g, jiġifieri estratt minn fwied mhux proċessat

▼**M8**

Taħlita ta’ S9: taħlita tal-frazzjoni tal-fwied S9 u tal-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metaboliċi.

Kontrolli tas-solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kolturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent waħdu użat biex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta’ dan il-metodu ta’ ttestjar.

Kontroll mhux trattat: kolturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri la sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu pproċessati fl-istess ħin u bl-istess mod bħall-kolturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

UVCB: Sustanzi Kimiċi b’Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti jew Materjali Bijoloġiċi b’Reazzjoni Kumplessa

▼M8

Appendiċi 2

FORMULI GĦALL-VALUTAZZJONI TAĊ-ĊITOTOSSIĊITÀ U TAL-FREKWENZA MUTANTI

Iċ-ċitotossiċità tiġi evalwata bis-sopravivenza relattiva, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni aġġustata f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (ara l-formula tal-RS aktar 'il quddiem).

Is-CE aġġustata għal koltura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$\text{CE aġġustata} = \frac{\text{Numru ta' ċelloli fi tmiem it} - \text{trattament}}{\text{Numru ta' ċelloli fil} - \text{bidu tat} - \text{trattament}}$$

RS aġġustata għal koltura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$\text{RS} = \frac{\text{CE aġġustata fil — koltura trattata}}{\text{Adjusted CE aġġustata fil} - \text{kontroll b'solvent}} \times 100$$

Il-frekwenza mutanti hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kolonji mutanti f'medium selettiv diviża bl-effiċjenza tal-klonazzjoni f'medium mhux selettiv imkejla għall-istess koltura fil-ħin tal-għażla.

$$\text{Frekwenza mutanti} = \frac{\text{Effiċjenza tal — klonazzjoni tal — kolonji mutanti f'medium selettiv}}{\text{Effiċjenza tal — klonazzjoni f'medium mhux selettiv}}$$

Meta l-pjastri jintużaw għall-effiċjenza tal-klonazzjoni:

CE = Numru ta' kolonji / Numbru ta' ċelloli pjastrati.

Meta l-mikropjastri jintużaw għall-effiċjenza tal-klonazzjoni:

In-numru ta' kolonji għal kull bwejra fil-mikropjastri jsegwi distribuzzjoni ta' Poisson.

Effiċjenza tal-Klonazzjoni = -LnP(0) / Numru ta' ċelloli pjastrati għal kull bwejra

Fejn -LnP(0) hu n-numru probabbli ta' bwejriet vojta mill-bwejriet miżrugħa u hu deskritt bil-formula li ġejja

LnP(0)= -Ln (numru ta' bwejriet vojta / numru ta' bwejriet pjastrati)

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. **TEST TAT-TIBDILTAL-ĠENI F'ĊELLULIMAMMIFERI *IN VITRO***

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. TIFSIRA

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Sistemi tal-kultura taċ-Ċelloli mammiferi jistgħu jintużaw għall-iskoperta ta' tibdil ikkaġunat minn sustanzi kimiċi. Linji taċ-Ċelloli li jintużaw ħafna jinkludu L5178Y ċelluli tal-limfoma tal-ġrieden u l-linji CHO u V-79 taċ-Ċelloli ta' ħamsters iniżi. F'dawn il-linji taċ-ċelluli is-sistemi li jintużaw l-iktar jikkalkulaw it-tibdil f'thymidine kinase (TK), hypoxanthine guanine phosphorybosyl transferase (HPRT) [21] u NA/K ATPase loci. Is-sistemi ta' tibdil TK u HPRT isibu t-tibdil ta' bażi ta' pari, tibdil frameshift u tħassir żgħir; is-sistema NA/K issib biss it-tibdil ta' bażi ta' pari. Ċelloli nieqsin minn thymidine kinase (TK), minħabba t-tibdil 'l-quddiem TK – T K, huma reżistenti għall-bromodeossiuridina (BrdU), il-fluworodeossiuridina (FdU)jew it-trifluworotimidina (TFT) billi dawn l-antimetaboliti m'humiex inkorporati f'nukleotidi taċ-Ċelloli permezz tas-sistema ta' l-enzimi tas-'salvataġġ' thymidine kinase; in-nukleotidi meħtieġa għall-metaboliżmu taċ-ċelluli jinkisbu biss minn sintesi de novo. Madankollu, fil-presenza ta' thymidine kinase BrdU, FdU jew TFT huma inkorporati fin-nukleotidi, bir-riżultat ta' l-inibizzjoni tal-metaboliżmu taċ-Ċelloli u ċ-ċitotossiċità. B'ħekk iċ-Ċelloli mutanti jistgħu jipproliferaw fil-preżenza ta' BrdU, FdU jew TFT filwaqt li ċ-Ċelloli normali, li fihom it-thymidine kinase, ma jistgħux. B'mod simili, iċ-Ċelloli nieqsin mill-HPRT jintgħażlu skond ir-reżistenza għal 8-ażagwanina (AG) jew 6-tiogwanina (TG). elluli b' NA/K ATPase alterati jintgħażlu skond ir-reżistenza għall-ouabain. Iċ-ċitotossiċità hija determinata billi jitkejjel l-effett tal-materjal tat-test fuq il-kapaċitajiet għall-formazzjoni tal-kolonji (l-effiċjenza ta' l-ikklonjar) jew ir-rati tat-tkabbir tal-kulturi. Il-frekwenza tal-mutanti hija determinata billi jinżergħu numri magħrufa ta' Ċelloli f'mezz li fih l-aġent selettiv għall-iskoperta ta' Ċelloli mutanti, u f'mezz mingħajr l-aġent selettiv biex ikunu determinati ċ-Ċelloli sopraviventi. Wara perjodu ta' l-inkubazzjoni xieraq, il-kolonji jingħaddu. Il-frekwenzi tal-mutanti huma mkejjla min-numru ta' kolonji ta' mutanti kkoreġuti għas-sopravivenza taċ-Ċelloli.

1.5. KRITERJI GĦALL-KWALITÀ

Xejn

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Preparazzjonijiet

Ċ e l l o l i

Hemm varjetà ta' linji ta' Ċelloli disponibbli għall-użu f'din l-analiżi. Dawn jinkludu subkloni ta' L5178Y, Ċelloli CHO jew Ċelloli V-79 b'sensitività murija għall-mutaġeni kimiċi, effiċjenza għolja ta' l-ikklonjar u frekwenza baxxa ta' tibdil spontanju. Iċ-Ċelloli jistgħu ikunu kkontrollati b'mod perjodiku għall-istabilità tal-karjotip u għandhom ikunu kkontrollati għall-kontaminazzjoni tal-Mycoplasma. Jistgħu jintużaw tipi oħra ta' Ċelloli jekk il-validità tagħhom bħala analiżi tat-tibdil tal-ġeni kkaġunat mill-kimiċi tista' tkun kompletament dokumentata.

M e z z

Mezzi ta' kultura u kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni xierqa (eż. temperatura, vettura għall-kultura, konċentrazzjonijiet ta' CO2 u umdità) għandhom jintużaw. Mezzi u sera għandhom jintgħażlu skond is-sistemi selettivi u t-tipi ta' Ċelloli użati fl-analiżi.

▼B

Sustanza tat-test

Sustanzi tat-test jistgħu ikunu ppreparati f'mezzi għall-kultura jew maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa qabel it-trattament taċ-Ċelloli. Il-konċentrazzjoni finali tal-vettura fis-sistema tal-kultura m'għandhiex taffettwa il-vijabilità tar-rata tat-tkabbir.

L-attivazzjoni metabolika

Iċ-Ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' l-attivazzjoni tal-metaboliżmu mammiferu esoġenu xierqa. B'mod alternattiv, meta jintużaw tipi ta' Ċelloli b'attività metabolika intrinsika ir-rata u n-natura ta' l-attività għandhom ikunu magħrufa li huma xierqa għall-klassi kimika li qed tkun ittestjata.

Kundizzjonijiet tat-test

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Kontrolli pożittivi, li jużaw kemm kompost attiv dirett kif ukoll kompost li jeħtieġ attivazzjoni metabolika, għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment; kontroll negattiv (tal-vettura) għandu jintuża ukoll.

Dawn li ġejjin huma eżempji ta' sustanzi li jistgħu jintużaw bħala kontrolli posittivi:

— komposti attivi diretti:

  — etilmetansulfonat;

  — hycanthone;

— komposti attivi indiretti:

  — 2-aċetilamminofluworin;

  — 7,12-dimetilbenżantraċene;

  — N-nitrosodimetilammina.

Meta xieraq, kontroll pożittiv addizzjonali ta' l-istess klassi kimika bħall-klassi kimika fit-test jista' jkun inkluż.

Konċentrazzjonijiet ta' l-espożizzjoni

Għandhom jintużaw bosta konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom joħolqu effett tossiku skond il-konċentrazzjoni, bl-oqħla konċentrazzjoni li toħloq livell baxx ta' sopravivenza u bis-sopravivenza fil-konċentrazzjoni l-iktar baxxa li tkun kważi l-istess daqs dik fil-kontroll negattiv. Sustanzi li relattivament ma jinħallux fl-ilma għandhom ikunu ttestjati sal-limitu tas-solubilità bl-użu ta' proċeduri xierqa. Għal sustanzi li m'humhiex tossiċi u li jinħallu faċilment fl-ilma, l-oqħla konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test għandha tkun determinata skond il-każ.

▼B

Proċedura

In-numru ta' ċelluli użati għal kull kultura għandu jkun skond il-frekwenza ta' tibdil spontanju; gwida ġenerali hija l-użu ta' numru ta' ċelluli vijabbli li huwa għaxar darbiet l-invers tal-frekwenza tat-tibdil spontanju. Iċ-Ċelloli għandhom ikunu esposti għal perjodu ta' ħin xieraq, fil-biċċa l-kbira tal-każijiet bejn sagħtejn u ħames sieħat huwa effettiv. Ċelluli mingħajr attività metabolika intrinsika suffiċjenti għandhom ikunu esposti għas-sustanza tat-test fil-preżenza u fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika xierqa. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, iċ-Ċelloli jinħaslu u jinħelsu mis-sustanza tat-test u jiġu kkultivati biex tkun determinata l-vijabilità u biex tkun tistà sseħħ l-espressjoni tal-fenotip tal-mutant. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espressjoni, li għandu jkun biżżejjed biex jippermetti espressjoni fenotipika kważi ottima, iċ-Ċelloli jitkabbru fil-mezz b'aġenti selettivi kif ukoll mingħajr aġenti selettivi għad-determinazzjoni tan-numri ta' mutanti u l-vijabilità. Ir-riżultati kollha jiġu ikkonfermati f'esperiment indipendenti.

2. **ID-DATA**

Id-data għandha tkun ippreżentata fil-forma ta' tabelli. Għandhom ikunu ppreżentati għadd u kontrolli individwali tal-platti għas-sustanza tat-test kemm għall-ikkaġunar tat-tibdil kif ukoll għas-sopravivenza. In-numru medju ta' kolonji għal kull platt u d-devjazzjoni standard għandhom jingħataw ukoll. Il-frekwenza tat-tibdil għandha tkun espressa bħala n-numru ta' mutanti skond in-numru ta' Ċelloli sopraviventi. L-effiċjenzi tas-sopravivenza u ta' l-ikklonjar huma espressi bħala perċentwali tal-livell tal-kontroll. Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi xierqa ta' l-istatistika.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni li ġejja:

— ir-razza użata, in-numru ta' kulturi ta' Ċelloli, il-metodi biex jinżammu l-kulturi taċ-Ċelloli;

— il-kundizzjonijiet tat-test: il-komposizzjoni tal-mezzi, il-konċentrazzjoni ta' CO2, il- konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, il-vettura użata, it-temperatura ta' l-inkubazzjoni, it-tul ta' l-inkubazzjoni, it-tul tal-perjodu għall-espressjoni (inkluż in-numru ta' Ċelloli miżrugħin u subkulturi u skedi ta' l-ikel, jekk xierqa), it-tul tat-trattament, id-densità taċ-ċelluli waqt it-trattament is-sistema għall-attivazzjoni metabolika, il-kundizzjonijiet tat-trattament: il-konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni, il-proċedura u t-tul tat-trattament, it-tip ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika mammifera użata, kontrolli pożittivi u negattivi, l-aġent selettiv użat; ir-raġuni għall-għażla tad-doża;

— il-metodu użat biex ikunu enumerati n-numri ta' Ċelloli vijabbli u mutanti;

— valutazzjoni statistika;

— id-diskussjoni tar-riżultati;

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. IL-VALUTAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

▼M8

B.22. TEST LETALI DOMINANTI TAR-RODITURI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 478 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu u tal-kunsiderazzjonijiet relatati mat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni modifikata tal-metodu ta' ttestjar tirrifletti aktar minn tletin sena esperjenza b'dan it-test u l-potenzjal għall-integrazzjoni jew għall-kombinament ta' dan it-test ma' testijiet oħra tat-tossiċità bħal studji dwar it-tossiċità fl-iżvilupp jew riproduttiva, jew dwar il-ġenotossiċità; madankollu, minħabba l-limitazzjonijiet tiegħu u l-użu ta' numru kbir ta' annimali, dan l-assaġġ mhuwiex maħsub biex jintuża bħala metodu primarju, iżda aktar bħala metodu ta' ttestjar supplimentari li jista' jintuża biss meta ma jkun hemm ebda alternattiva għar-rekwiżiti regolatorji. Il-kombinament tal-ittestjar tat-tossiċità għandu l-potenzjal li jiffranka numri kbar ta' annimali mill-użu fit-testijiet tat-tossiċità. L-OECD żviluppa dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (1).

2. L-iskop tat-test Letali Dominanti (DL) hu li jinvestiga jekk is-sustanzi kimiċi jipproduċux mutazzjonijiet li jirriżultaw minn aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli ġerminali. Barra minn hekk, it-test letali dominanti hu rilevanti għall-valutazzjoni tal-ġenotossiċità għaliex, għalkemm jistgu jvarjaw bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetika u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-rispons. L-induzzjoni ta' mutazzjoni DL wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test tindika li s-sustanza kimika affettwat it-tessut ġerminali tal-annimal tat-test.

3. Il-mutazzjonijiet tad-DL jikkawżaw mewt embrijoniku jew tal-fetu. L-induzzjoni ta' mutazzjoni DL wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test tindika li s-sustanza kimika affettwat iċ-ċelloli ġerminali tal-annimal tat-test.

4. Assaġġ tad-DL hu siewi għall-konferma ta' riżultati pożittivi ta' testijiet bl-użu ta' punti ta' tmiem somatiċi *in vivo*, u hu punt ta' tmiem rilevanti għat-tbassir tal-periklu għall-bniedem u tar-riskju ta' mardiet ġenetiċi trażmessi permezz tal-linja ġerminali. Madankollu, dan l-assaġġ jeħtieġ numru kbir ta' annimali u jinvolvi xogħol intensiv; għaldaqstant, hu għali ħafna u jieħu ż-żmien biex isir. Minħabba li l-frekwenza spontanja tal-mutazzjonijiet letali dominanti hi kemxejn għolja, is-sensittività tal-assaġġ għad-detezzjoni ta' żidiet żgħar fil-frekwenza tal-mutazzjonijiet ġeneralment tkun limitata.

5. Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

6. It-test isir l-aktar bil-ġrieden (2) (3) (4) iżda f'ċerti każijiet jistgħu jkunu xierqa speċijiet oħra, bħall-firien (5) (6) (7) (8), jekk ikunu xjentifikament ġustifikati. Id-DLs ġeneralment ikunu r-riżultat ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi kbar (anormalitajiet strutturali u numeriċi) (9) (10) (11), iżda mutazzjonijiet tal-ġeni ma jistgħux ikunu eskluż. Mutazzjoni tad-DL hi mutazzjoni

▼M8

li sseħħ f'ċellola ġerminali minnha nfisha, jew tiġi ffissata wara l-fertilizzazzjoni fl-embrijun bikri, li ma tikkawżax disfunzjoni tal-gamet, iżda hi letali għall-bajda fertilizzata jew għall-embrijun li jkun qed jiżviluppa.

7. L-irġiel individwali jitgħammru b'mod sekwenzjali ma' nisa verġni f'intervalli xierqa. In-numru ta' drabi li jitgħammru wara t-trattament jiddependi mill-iskop finali tal-istudju tad-DL (Paragrafu 23) u għandu jiżgura li l-fażijiet kollha tal-maturazzjoni taċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel jiġu evalwati għad-DLs (12).

8. Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, ma jkunux se jilħqu t-testikoli, ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

9. Ġeneralment, l-annimali rġiel jiġu esposti għal sustanza kimika tat-test b'rotta ta' esponiment xierqa u jitgħammru ma' nisa verġni mhux trattati. Tipi differenti ta' ċelloli ġerminali jistgħu jiġu ttestjati bl-użu ta' intervalli ta' tgħammir sekwenzjali. Wara t-tgħammir, in-nisa jiġu ewtanizzati wara perjodu ta' żmien xieraq, u l-utri tagħhom jiġu eżaminati biex jiġu determinati n-numri ta' impjanti u ta' embrijuni ħajjin u mejtin. Il-letalità dominanti ta' sustanza kimika tat-test hi determinata bit-tqabbil tal-impjanti ħajjin għal kull mara fil-grupp trattat mal-impjanti ħajjin għal kull mara fil-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent. Iż-żieda fl-impjanti mejtin f'kull waħda tas-sess femminil fil-grupp trattat diviż bin-numru ta' impjanti mejtin f'kull waħda tas-sess femminil fil-grupp tal-kontroll turi t-telf ta' wara l-impjantazzjoni indott mis-sustanza kimika tat-test. It-telf ta' wara l-impjantazzjoni jiġi kkalkolat bid-determinazzjoni tal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp tal-kontroll. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni tista' tkun stimata billi jitqabbel l-għadd ta' *corpora lutea* nieqes l-impjanti totali jew l-impjanti totali għal kull mara fil-gruppi trattati u tal-kontroll.

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

10. Il-kompetenza f'dan l-assaġġ għandha tiġi stabbilita billi tintwera l-ħila li jiġu rirpodotti frekwenzi letali dominanti minn *data* ppubblikata (eż. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) b'sustanzi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfa) bħal dawk elenkati fit-Tabella 1, u b'kontrolli bil-veikoli u billi jinkisbu frekwenzi tal-kontroll negattiv li jkunu medda aċċettabbli konssitenti ta' *data* (ara r-referenzi aktar 'il fuq) jew bid-distribuzzjoni storika tal-kontroll tal-laboratorju, jekk disponibbli.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

11. Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali sesswalment maturi f'saħħithom. Il-ġrieden jintużaw spiss iżda l-firien jistgħu jkunu adattati wkoll. Tista' tintuża kwalunkwe speċi ta' mammiferi xierqa oħra, jekk tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika fir-rapport.

▼M8

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali

12. Għar-rodituri, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C (±3 °C). Għalkemm idealment l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun ta' tal-anqas 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, segwita minn 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Qabel it-trattament jew it-tgħammir, ir-rodituri għandhom jinżammu fi gruppi żgħar (mhux aktar minn ħamsa) tal-istess sess jekk ma tkun mistennija jew osservata ebda mġiba aggressiva, idealment f'gaġeġ solidi b'arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat.

Preparazzjoni tal-annimali

13. L-annimali adulti rġiel u nisa f'saħħithom u sesswalment maturi jkunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu uman u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikroċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fis-swaba' u fil-widnejn) u jitħallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-anqas ħamest ijiem. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u mis-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx ± l-20 % tal-piż medju ta' kull sess.

Preparazzjoni tad-doża

14. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi jew f'veikoli xierqa jew jitħalltu f'dieta jew f'ilma tax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għall-esponimenti bit-teħid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

Kundizzjonijiet tat-test

Solvent/veikolu

15. Is-solvent/il-veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-volumi tad-doża użati, u ma għandux ikun suspettat li joħloq reazzjoni kimika mas-sustanza kimika tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħra li ma jkunux magħrufa sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' *data ta'* riferiment li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Hu rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu l-ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetil, żejt taż-żebbuġa u żejt tal-qamħirrum.

Kontrolli pożittivi

16. Dejjem għandhom jintużaw annimali tal-kontroll pożittiv konkorrenti sakemm il-laboratorju ma jkunx wera profiċjenza fit-twettiq tat-test u jkun uża t-test bħala rutina fl-imgħoddi riċenti (eż. matul l-aħħar ħames snin). Madankollu, ma hemmx bżonn li l-annimali tal-kontroll pożittiv jiġu ttrattati bl-istess rotta bħall-annimali li jirċievu s-sustanza kimika tat-test, jew li jiġu

▼M8

kampjunati l-intervalli tat-tgħammir kollha. Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom ikunu magħrufa li jipproduċu DLs bil-kundizzjonijiet użati għat-test. Ħlief għat-trattament, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom ikunu maniġġati b'mod identiku bħall-annimali fil-gruppi trattati.

17. Id-doża tas-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom jintgħażlu biex jipproduċu effetti dgħajfa jew moderati li jivvalutaw b'mod kritiku l-prestazzjoni u s-sensittività tal-assaġġ, iżda li konsistentement jipproduċu effetti letali dominanti pożittivi. Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv u tad-doża xierqa.

Tabella 1

Eżempji ta' Sustanzi tal-Kontroll Pożittiv

Sustanza [Nru CAS] (nru ta' riferiment)	Medda tad-Doża Effettiva (mg/kg) (speċi tar-rodituri)	Żmien tal-Amministrazzjoni (jiem)
Trietilenmelamina [51-18-3] (15)	0,25 (ġrieden)	1
Ċiklofosfammid [50-18-0] (19)	50-150 (ġrieden)	5
Ċiklofosfammid [50-18-0] (5)	25-100 (firien)	1
Metansulfonat tal-etil [62-50-0] (13)	100-300 (ġrieden)	5
Akrilammid Monomeriku [79-06-1] (17)	50 (ġrieden)	5
Klorambusil [305-03-3] (14)	25 (ġrieden)	1

Kontrolli negattivi

18. L-annimali tal-kontrolli negattivi, trattati b'solvent jew b'veikolu waħdu, u mill-bqija trattati bl-istess mod bħall-gruppi tal-kura, għandhom ikunu inklużi għal kull ħin tal-kampjunar (20). Fin-nuqqas ta' *data* tal-kontroll storika jew ippubblikata li turi li ma kien indott ebda DL jew effett ta' tħassir ieħor mis-solvent/mill-veikolu magħżul, l-annimali tal-kontroll mhux trattati għandhom ikunu inklużi wkoll għal kull ħin tal-kampjunar biex tiġi stabbilita aċċettabbiltà tal-kontroll tal-veikolu.

PROĊEDURA

Għadd ta' Annimali

19. L-irġiel individwali jitgħammru b'mod sekwenzjali f'intervalli predeterminati xierqa (eż. intervalli ta' kull ġimgħa, Paragrafi 21 u 23), idealment ma' mara verġni waħda. L-għadd ta' rġiel għal kull grupp għandu jkun predeterminat biex ikun biżżejjed (flimkien man-numru ta' nisa mgħammra f'kull intervall ta' tgħammir) biex tiġi pprovduta s-saħħa statistika neċessarja biex tal-anqas jiġi individwat irdoppjar tal-frekwenza tad-DL (Paragrafu 44).

20. L-għadd ta' nisa għal kull intervall ta' tgħammir ukoll għandu jkun predeterminat mill-kalkoli tas-saħħa statistika biex tal-anqas ikun jista' jiġi individwat irdoppjar fil-frekwenza tad-DL (jiġifieri biżżejjed nisa tqal biex jipprovdu tal-anqas 400 impjant totali) (20) (21) (22) (23) u li tal-anqas ikun mistenni impjant mejjet wieħed għal kull unità ta' analiżi (jiġifieri grupp ta' tgħammir għal kull doża) (24).

▼M8

Perjodu ta' Amministrazzjoni u l-Intervalli ta' Tgħammir

21. L-għadd ta' intervalli ta' tgħammir wara t-trattament hu regolat bl-iskeda tat-trattament u għandu jiżgura li l-fażijiet kollha ta' maturazzjoni taċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel jiġu evalwati għall-induzzjoni tad-DL (12) (25). Għal trattament wieħed sa ħames amministrazzjonijiet tad-doża kuljum, għandu jkun hemm tmien istanzi ta' tgħammir (ġrieden) jew 10 (firien) imwettqa f'intervalli ta' kull ġimgħa wara l-aħħar trattament. Għal amministrazzjoni b'doża multipla, l-għadd ta' intervalli ta' tgħammir jista' jitnaqqas b'mod proporzjonat għaż-żmien miżjud tal-perjodu ta' amministrazzjoni, iżda jinżamm l-għan ta' evalwazzjoni tal-fażijiet kollha ta' spermatoġenesi (eż. wara esponiment għal 28 jum, erba' istanzi ta' tgħammir fil-ġimgħa biss ikunu biżżejjed biex jiġu evalwati l-fażijiet kollha tal-ispermatoġenesi fil-ġurdien). L-iskedi kollha ta' trattament u ta' tgħammir għandhom ikunu xjentifikament ġustifikati.

22. In-nisa għandhom jibqgħu mal-irġiel tal-anqas għad-durata ta' ċiklu estruż wieħed (eż. ġimgħa tkopri ċiklu estruż wieħed fil-ġrieden kif ukoll fil-firien). In-nisa li ma jitgħammrux matul intervall ta' ġimgħa jistgħu jintużaw għal intervall sussegwenti ta' tgħammir. Inkella, sakemm iseħħ it-tgħammir, kif determinat mill-preżenza ta' sperma fil-vaġina jew mill-preżenza ta' tapp vaġinali.

23. Ir-reġimen ta' esponiment u ta' tgħammir użat jiddependi mill-iskop finali tal-istudju tad-DL. Jekk l-għan hu li jiġi determinat jekk sustanza kimika partikolari tinduċix mutazzjonijiet tad-DL *per se*, il-metodu aċċettat ikun li tiġi esposta serje sħiħa ta' spermatoġenesi (eż. seba' ġimgħat fil-ġurdien, minn ħamsa sa sebgħa trattamenti fil-ġimgħa) u tgħammir ta' darba fl-aħħar. Madankollu, jekk l-għan hu li jiġi identifikat it-tip ta' ċellola ġerminali sensittiva għall-induzzjoni tad-DL, ikun preferut esponiment ta' darba jew fuq ħames jiem segwit minn tgħammir darba fil-ġimgħa.

Livelli tad-doża

24. Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda *data* xierqa diġà disponibbli biex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jridu jintużaw fl-istudju ewlieni (26). L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala l-ogħla doża li tiġi tollerata mingħajr evidenza ta' tossiċità li tillimita l-istudju, b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, imġiba jew reazzjonijiet anormali, dipressjoni minuri tal-piż tal-ġisem jew ċitotossiċità tas-sistema ematopoetika), iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigħ, ta' tbatija jew ta' diffikultà li jeħtieġu ewtanażja umanitarja (27).

25. L-MTD lanqas ma tista' taffettwa b'mod avvers is-suċċess tat-tgħammir (21).

26. Is-sustanzi kimiċi tat-test b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi mhux tossiċi baxxi (bħal ormoni u mitoġeni), u sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni ta' proprjetajiet tossikokinetiċi jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' tfassil tad-dożi u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

27. Biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju sħiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv u tal-anqas tliet livelli ta' dożi ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda mhux akbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċix tossiċità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-*data* eżistenti, l-ogħla doża għal amministrazzjoni waħda għandha tkun ta' 2 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem. Madankollu, jekk is-sustanza kimika

▼M8

tat-test tikkaġuna tossiċità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom idealment ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew ebda tossiċità. Għal sustanzi kimiċi mhux tossiċi, id-doża limitu għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew aktar hi ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, u għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' anqas minn 14-il jum id-doża limitu hi ta' 2 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum.

Amministrazzjoni tad-Doża

28. Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħażlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja, fil-vini, bit-teħid man-nifs, orali (b'gavage), jew b'impjantazzjoni, kif ġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħażel biex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Normalment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li ma tkunx rotta intiża ta' esponiment tal-bniedem, u għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew l-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wieħed, wieħed għandu joqgħod attent li l-ħin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u t-tgħammir ikun biżżejjed biex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (paragrafu 31). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew b'injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun ta' aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża massimu ta' 2 ml/100 g. L-użu ta' volumi akbar minn dan (jekk ikunu permessi mil-leġiżlazzjoni dwar it-trattament xieraq tal-annimali) għandu jkun iġġustifikat. Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

Osservazzjonijiet

29. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrin jidhru l-aktar l-effetti antiċipati. Tal-inqas darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' dożaġġ, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għall-morbiditá u għall-mortalitá. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju u tal-anqas darba fil-ġimgħa matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-ħin tal-ewtanażja. Il-kejlijiet tal-konsum tal-ikel għandu jsir tal-anqas darba kull ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-anqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanizzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (27).

Ġbir u Proċessar tat-Tessuti

30. In-nisa jiġu ewtanizzati fit-tieni nofs tat-tqala fil-jum tal-ġestazzjoni (GD), 13 għall-ġrieden u GD 14-15 għall-firien. L-utri jiġu eżaminati għal effetti letali dominanti biex jiġi determinat in-numru ta' impjanti, ta' embrijuni ħajjin u mejtin, u ta' *corpora lutea*.

31. Il-qrejjen tal-utru u l-ovarji jiġu esposti għall-għadd tal-*corpora lutea*, u l-feti jitneħħew, jingħaddu u jintiżnu. Għandha tingħata attenzjoni biex l-utri jiġu eżaminati għal riassorbimenti oskurati minn feti ħajjin u biex jiġi żgurat li r-riassorbimenti kollha jiġu enumerati. Tiġi reġistrata l-mortalitá tal-feti. In-numru ta' nisa mtaqqla b'suċċess u n-numru ta' impjantazzjonijiet totali, it-telf qabel l-impjantazzjoni, u l-mortalitá ta' wara l-impjantazzjoni (inklużi r-riassorbimenti bikrin u tardivi) jiġu reġistrati wkoll. Barra minn hekk, il-feti

▼M8

viżibbli jistgħu jiġu preservati fil-fissattiv ta' Bouin għal tal-anqas ġimagħtejn (2) u mbagħad jiġu eżaminati għal malformazzjonijiet esterni maġġuri (28) biex tiġi pprovduta informazzjoni addizzjonali dwar l-effetti riproduttivi u fuq l-iżvilupp tal-aġent tat-test.

DATA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

32. Id-*data* għandha tkun fil-forma ta' tabelli biex turi n-numru ta' annimali rġiel mgħammra, in-numru ta' nisa tqal, u n-numru ta' nisa li mhumiex tqal. Ir-riżultati ta' kull tgħammir, inkluża l-identità ta' kull raġel u mara għandhom ikunu rrapportati b'mod individwali. L-intervall tat-tgħammir, il-livell tad-doża għall-irġiel ittrattati, u n-numri ta' impjanti ħajjin u ta' impjanti mejtin għandhom jiġu enumerati għal kull mara.

33. It-telf ta' wara l-impjantazzjoni jiġi kkalkolat bid-determinazzjoni tal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali mill-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjantazzjonijiet totali mill-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent.

34. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni hu kkalkolat bħala d-differenza bejn in-numru ta' *corpora lutea* u n-numru ta' impjanti jew bħala tnaqqis fin-numru medju ta' impjanti għal kull mara meta mqabbel mat-tgħammir tal-kontroll. Meta jkun stimat it-telf ta' qabel l-impjantazzjoni, għandu jkun irrapportat.

35. Il-fattur Letali Dominanti jiġi stmat bħala: (l-imwiet ta' wara l-impjantazzjoni/l-impjantazzjonijiet totali għal kull mara) × 100.

36. Għandha tiġi rrapportata d-*data* dwar it-tossiċità u s-sinjali kliniċi (skont il-Paragrafu 29).

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

37. Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabbiltà ta' test.

— Il-kontroll negattiv konkorrenti hu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll negattiv, u mad-*data* storika tal-kontroll tal-laboratorju jekk tkun disponibbli (ara l-Paragrafi 10 u 18).

— Il-kontrolli pożittivi konkorrenti jinduċu risponsi li jkunu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll pożittiv, jew mal-bażi tad-*data* storika tal-kontroll pożittiv tal-laboratorju, jekk disponibbli, u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-Paragrafi 17 u 18).

— Ġew analizzati numru adegwat ta' impjanti totali u dożi (Paragrafu 20).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-Paragrafi 24 u 27.

Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

38. Tal-anqas tliet gruppi tad-doża kkurati għandhom jiġu analizzati biex tiġi pprovduta biżżejjed *data* għal analiżi tar-rispons għad-doża.

▼**M8**

39. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva biċ-ċar jekk:

— tal-anqas waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;

— iż-żieda tkun relatata mad-doża f'tal-anqas kundizzjoni sperimentali waħda (eż. intervall tat-tgħammir ta' kull ġimgħa) meta evalwata b'test xieraq; u,

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mill-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson) jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li kapaċi tinduċi mutazzjonijiet letali dominanti fiċ-ċelloli ġerminali tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa huma deskritti fil-Paragrafu 44; approċċi statistiċi rakkomandati oħra jistgħu jinstabu fid-dokumentazzjoni (20) (21) (22) (24) (29). It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal bħala l-unità sperimentali.

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva biċ-ċar jekk:

— l-ebda waħda mid-dożi tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;

— ma jkun hemm ebda żieda relatata mad-doża f'xi kundizzjoni sperimentali; u

— ir-riżultati kollha jaqgħu fi ħdan il-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson), jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li ma tkunx kapaċi tinduċi mutazzjonijiet letali dominanti fiċ-ċelloli ġerminali tal-annimali tat-test.

41. Ma hemm l-ebda ħtieġa għal verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

42. Jekk ir-rispons ma jkunx negattiv jew pożittiv b'mod ċar, u bħala għajnuna għall-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda dgħajfa jew ambigwa), id-*data* għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri li jużaw id-*data* sperimentali eżistenti, bħal kunsiderazzjoni ta' jekk ir-riżultat pożittiv jaqax barra mill-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll negattiv, jew ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (30).

43. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u għaldaqstant jiġi konklużż bħala ekwivoku.

44. It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal raġel bħala l-unità sperimentali. Filwaqt li hu possibbli li d-*data* dwar l-għadd (eż. in-numru ta' impjanti għal kull mara) tista' tkun distribwita skont Poisson u/jew il-proporzjonijiet (eż. il-proporzjon ta' impjanti mejtin) jistgħu jkunu distribwiti b'mod binomjali, spiss ikun il-każ li t-tali *data* tkun mifruxa wisq (31). Għaldaqstant, l-ewwel l-analiżi statistika għandha tuża test għal dispersjoni eċċessiva jew subottimali billi tuża testijiet tal-varjanza bħat-test tal-varjanza binomjali ta' Cochran (32) jew it-test C(α) ta' Tarone għad-dispersjoni binomjali eċċessiva (31) (33). Jekk ma jiġi individwat ebda tbegħid mid-dispersjoni binomjali, it-tendenzi fil-proporzjonijiet bejn il-livelli tad-doża jistgħu jiġu ttestjati bl-użu tat-test tat-tendenzi ta' Cochran-Armitage (34) u l-paraguni fil-livell tal-pari mal-grupp tal-kontroll jistgħu jiġu ttestjati

▼M8

bl-użu tat-test eżatt ta' Fisher (35). Bl-istess mod, jekk ma jiġi individwat ebda tbegħid mid-dispersjoni ta' Poisson, it-tendenzi fl-għadd jistgħu jiġu ttestjati bl-użu tar-rigressjoni ta' Poisson (36) u l-paraguni fil-livell tal-pari mal-grupp tal-kontroll jistgħu jiġu ttestjati fi ħdan il-kuntest tal-mudell Poisson, bl-użu tal-kuntrasti bejn il-pari (36). Jekk tiġi individwata dispersjoni eċċessiva jew subottimali, huma rakkomandati metodi mhux parametriċi (23) (31). Dawn jinkludu testijiet ibbażati fuq il-klassifikazzjonijiet, bħat-test Jonckheere-Terpstra għat-tendenza (37) u t-testijiet Mann-Whitney (38) għall-paraguni bejn il-pari mal-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent, kif ukoll it-testijiet tal-permutazzjoni, tal-kampjunar mill-ġdid, jew bootstrap għall-paraguni tat-tendenzi u bejn il-pari mal-grupp tal-kontroll (31) (39).

45. Assaġġ tad-DL pożittiv jipprovdi evidenza għall-ġenotossiċità tas-sustanza kimika tat-test fiċ-ċelloli ġerminali tar-raġel trattati tal-ispeċi tat-test.

46. Kunsiderazzjoni ta' jekk il-valuri osservati humiex fi ħdan jew barra l-medda ta' kontroll storiku tista' tipprovdi gwida meta tiġi evalwata s-sinifikanza bijoloġika tar-rispons (40).

Rapport tat-Test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja.

Sommarju.

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

▼**M8**

— il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-teħid man-nifs;

— id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż. l-istabbiltà, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

L-annimali tat-test:

— l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla,

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-metodu tal-identifikazzjoni unika tal-annimali;

— għal studji fuq terminu qasir: il-piż tal-ġisem individwali tal-annimali rġiel fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— *data* tal-kontrolli pożittivi u negattivi (veikolu/solvent);

— *data* mill-istudju ta' sejbien tal-medda,

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni;

— metodi għall-kejl tat-tossiċità tal-annimali, inklużi, fejn disponibbli, l-analiżijiet istopatoloġiċi jew ematoloġiċi u l-frekwenza li biha saru l-osservazzjonijiet u ttieħdu l-piżijiet tal-ġisem tal-annimali;

— il-metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laħqet it-tessut fil-mira, jew iċ-ċirkolazzjoni ġenerali, jekk jinkisbu riżultati negattivi;

— id-doża proprja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— dettalji dwar l-arrikkiment tal-ambjent tal-gaġeġ;

— deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet;

— il-metodu tal-analġeżija;

— il-metodu tal-ewtanażja;

▼**M8**

— il-proċeduri għall-iżolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;

— is-sors u n-numri tal-lott tal-kitts u tar-reaġenti kollha (fejn applikabbli);

— il-metodi għall-enumerazzjoni tad-DLs;

— l-iskeda tat-tgħammir;

— il-metodi użati biex ikun determinat li seħħ it-tgħammir;

— il-ħin tal-ewtanażja;

— il-kriterji għall-għoti ta' punteġġ lill-effetti tad-DL, inklużi l-*corpora lutea*, l-impjantazzjonijiet, ir-riassorbimenti u t-telf ta' qabel l-impjantazzjoni, l-impjanti ħajjin, l-impjanti mejta.

Ir-riżultati:

— il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;

— il-piż tal-ġisem tal-irġiel matul il-perjodi tat-trattament u tat-tgħammir;

— in-numru ta' nisa mgħammra;

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;

— id-*data* konkorrenti u storika tal-kontroll negattiv bil-meded, bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;

— id-*data* konkorrenti tal-kontroll pożittiv;

— id-*data* f'tabelli għal kull omm inklużi: in-numru ta' *corpora lutea* għal kull omm; in-numru ta' impjantazzjonijiet għal kull omm; in-numru ta' riassorbimenti u ta' telf ta' qabel l-impjantazzjoni għal kull omm; in-numru ta' impjanti ħajjin għal kull omm; in-numru ta' impjanti mejtin għal kull omm; il-piżijiet tal-feti;

— id-*data* ta' hawn fuq miġbura għal kull perjodu ta' tgħammir u doża, bil-frekwenzi Letali Dominanti;

— l-analiżijiet u l-metodi statistiċi applikati.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjoni.

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariġi.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, f'Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., u Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. u Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. u Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. u Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. u Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., u Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. u Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. u Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., u Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. u Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. u Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. u Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. u Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. u Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. u Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. u Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. u Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. u Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. u Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. u Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., u Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. u Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J u Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. u Thybaud V. (2011). "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. u ishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. F'*Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. u Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman u Hall, Londra (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. u Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, il-Kapitli 14 u 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

Corpora lutea (*lutea*): l-istruttura tas-sekrezzjoni ormonali fformata fuq l-ovarju fis-sit ta' follikolu li jkun ħeles il-bajda. In-numru ta' *corpora lutea* fl-ovarji jikkorrispondi għan-numru ta' bajd li ġew ovulati.

Mutazzjoni Letali Dominanti: mutazzjoni li sseħħ f'ċellola ġerminali, jew li tiġi fissa wara l-fertilizzazzjoni, li tikkawża mewta embrijonika jew fetali.

Rata ta' fertilità: in-numru ta' nisa tqal mgħammra fuq in-numru ta' nisa mgħammra.

Intervall tat-tgħammir: il-ħin bejn tmiem l-esponiment u t-tgħammir tal-irġiel trattati. Bil-kontroll ta' dan l-intervall, ikunu jistgħu jiġu vvalutati l-effetti kimiċi fuq it-tipi differenti ta' ċelloli ġerminali. Fit-tgħammir tal-ġrieden matul il-ġimgħat numru 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 wara tmiem l-esponiment ikejjel l-effetti fl-isperma, fl-ispermatidi kondensi, fl-ispermatidi tondi, fl-ispermatoċiti pakiten, fl-ispermatoċiti bikrin, fl-ispermatogonji differenzjati, fl-ispermatogonji tad-differenzazzjoni u fl-ispermatogonji taċ-ċelloli staminali.

Telf ta' qabel l-impjantazzjoni: id-differenza bejn in-numru ta' impjanti u n-numru ta' *corpora lutea*. Dan jista' jiġi stmat ukoll billi jitqabblu l-impjanti totali għal kull mara fil-grupp trattat u fil-grupp tal-kontroll.

Telf ta' wara l-impjantazzjoni: il-proporzjon tal-impjanti mejtin fil-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp tal-kontroll.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanza Kimika b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti u Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

▼**M8**

Appendiċi 2

TWAQQIT TAL-ISPERMATOĠENESI FIL-MAMMIFERI

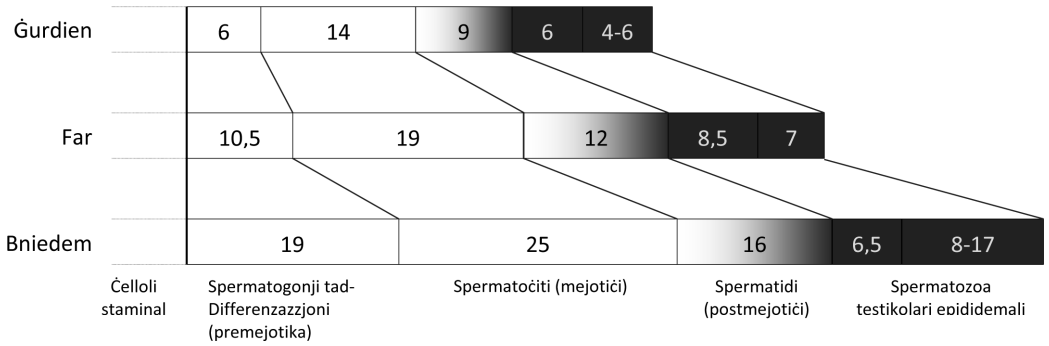


Fig.1: Tqabbil tad-durata (jiem) tal-iżvilupp taċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel fil-ġrieden, fil-firien u fil-bnedmin. It-tiswija tad-DNA ma sseħħx matul il-perjodi indikati mit-tidwil.

Skematika tal-ispermatoġenesi fil-ġrieden, fil-firien u fil-bniedem hi murija hawn fuq (meħuda minn Adler, 1996). L-ispermatogonji mhux differenzjati jinkludu: A-singla; A-pari; u spermatogonji A-allinjati (Hess u de Franca, 2008). A-singla titqies bħala ċ-ċelloli staminali veri; għalhekk, biex jiġu vvalutati l-effetti fuq iċ-ċelloli staminali jridu jgħaddu tal-anqas 49 jum (fil-ġrieden) bejn l-aħħar injezzjoni tas-sustanza kimika tat-test u t-tgħammir.

Referenzi

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Fi: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences u Springer Science&Business Media:1-15.

▼M8

B.23. TEST TAL-ABERRAZZJONI FIL-KROMOŻOMI SPERMATOGONI TAL-MAMMIFERI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 483 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu u tal-kunsiderazzjonijiet relatati mat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni modifikata tal-metodu ta' ttestjar tirrifletti ħafna snin ta' esperjenza b'dan l-assaġġ u l-potenzjal għall-integrazzjoni jew għall-kombinament ta' dan it-test ma' studji oħra dwar it-tossiċità jew il-ġenotossiċità. Il-kombinament tal-istudji tat-tossiċità għandu l-potenzjal li jnaqqas in-numri ta' annimali użati fl-ittestjar tat-tossiċità. Dan il-metodu ta' ttestjar hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppa dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (1).

2. L-għan tat-test *in vivo* tal-aberazzjoni fil-kromożomai spermatogoni tal-mammiferi hu li jidentifika dawk is-sustanzi kimiċi li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fiċ-ċelloli spermatogoni tal-mammiferi (2) (3) (4). Barra minn hekk, dan it-test hu rilevanti għall-valutazzjoni tal-ġenotossiċità għaliex, għalkemm ivarjaw bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetika u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-rispons. Dan il-metodu ta' ttestjar mhuwiex imfassal biex ikejjel l-anormalitajiet numeriċi; l-assaġġ ma jintużax bħala rutina għal dan l-għan.

3. Dan it-test ikejjel l-aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali (kemm tat-tip kromożomiku u kromatidiku) fid-diviżjoni taċ-ċelloli ġerminali spermatogoni u, għalhekk, hu mistenni jkun ibassar mutazzjonijiet li jintirtu f'dawn iċ-ċelloli ġerminali.

4. Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

5. F'dan it-test spiss jintużaw rodituri, iżda f'ċerti każijiet jista' jkun hemm speċijiet oħrajn li jkunu xierqa, jekk ikunu xjentifikament ġustifikati. Il-preparati ċitoġenetiċi standard tat-testikoli tar-rodituri jiġġeneraw metafażijiet mitotiċi (spermatogonji) u mejotiċi (spermatoċiti). Il-metafażijiet mitotiċi u mejotiċi huma identifikati fuq il-bażi tal-morfoloġija tal-kromożomi (4). Dan it-test ċitoġenetiku *in vivo* jindividwa aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-mitożijiet spermatogoni. Ċelloli oħra mmirati mhumiex l-oġġett ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

6. Biex jiġu individwati aberrazzjonijiet tat-tip kromatidiku f'ċelloli spermatogoni, l-ewwel diviżjoni taċ-ċelloli mitotiċi wara t-trattament għandha tiġi eżaminata qabel ma dawn l-aberrazzjonijiet jiġu konvertiti f'aberrazzjonijiet tat-tip kromożomatiku f'diviżjonijiet sussegwenti taċ-ċelloli. Informazzjoni addizzjonali mill-ispermatoċiti trattati tista' tinkiseb b'analiżi tal-kromożomi mejotiċi għal aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-metafażi I u fil-metafażi II tad-dijakineżi.

▼M8

7. Numru ta' ġenerazzjonijiet ta' spermatogonji huma preżenti fit-testikoli (5), u dawn it-tipi differenti ta' ċelloli ġerminali jista' jkollhom spettru ta' sensittività għat-trattament bis-sustanza kimika. B'hekk, l-aberrazzjonijiet individwati jirrappreżentaw rispons aggregat ta' popolazzjonijiet ta' ċelloli spermatogoni trattati. Il-maġġoranza taċ-ċelloli mitotiċi fil-preparati tat-testikoli huma spermatogonji B, li għandhom ċiklu taċ-ċelloli ta' madwar 26 siegħa (3).

8. Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, ma jkunux se jilħqu t-testikoli, ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

9. Ġeneralment, l-annimali jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test b'rotta ta' esponiment xierqa u jiġu ewtanizzati fi żminijiet xierqa wara t-trattament. Qabel l-ewtanażja, l-annimali jiġu ttrattati b'inibitur tal-metafaži (eż. kolkiċina jew Colcemid®). Imbagħad isiru preparati ta' kromożomi miċ-ċelloli ġerminali u jiġu mtebbgħin, u ċ-ċelloli metafażiċi jiġu analizzati għal aberrazzjonijiet kromożomiċi.

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

10. Il-kompetenza f'dan l-assaġġ għandha tiġi stabbilita billi tintwera l-ħila li jiġu riprodotti r-riżultati mistennija għall-frekwenzi ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fl-ispermatogonji b'sustanzi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfa) bħal dawk elenkati fit-Tabella 1 u jinkisbu frekwenzi tal-kontroll negattiv li jkunu konsistenti mal-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll fid-dokumentazzjoni ippubblikata (eż. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) jew mad-distribuzzjoni storika tal-kontroll tal-laboratorju, jekk disponibbli.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

11. Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali adulti żgħar b'saħħithom. Spiss jintużaw ġrieden irġiel; madankollu, l-irġiel ta' speċijiet ta' mammiferi xierqa oħra jistgħu jintużaw meta dan ikun xjentifikament ġustifikat u biex dan it-test ikun jista' jsir flimkien ma' metodu ta' ttestjar ieħor. Fir-rapport għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika meta jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex rodituri.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u tal-għalf tal-annimali

12. Għar-rodituri, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C (±3 °C). Għalkemm idealment l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun tal-anqas ta' 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Ir-rodituri għandhom jinżammu fi gruppi żgħar (mhux aktar minn ħamsa f'kull gaġġa) jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva, idealment f'gaġeġ solidi (ta' mal-art) b'arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat.

▼M8

Preparazzjoni tal-annimali

13. Normalment jintużaw annimali rġiel adulti żgħar f'saħħithom (8-12-il ġimgħa fil-bidu tal-kura) u dawn jiġu assenjati b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u tal-kura. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu uman u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikroċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fil-widnejn jew fis-swaba') u jitħallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-anqas ħamest ijiem. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u mis-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni bejn il-piżijiet tal-annimali individwali għandha tkun minima u ma taqbiżx ± - l-20 %.

Preparazzjoni tad-doża

14. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi jew f'veikoli xierqa jew jitħalltu f'dieta jew f'ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponimenti bit-teħid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

Kundizzjonijiet tat-test - Solvent/veikolu

15. Is-solvent/veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli tad-doża użati, u ma għandux ikun kapaċi li joħloq reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħra li ma jkunux magħrufa sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' *data ta'* riferiment li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Hu rrakkomandat li, kull fejn ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz likwidu. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu l-ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetil, żejt taż-żebbuġa u żejt tal-qamħirrum. Fin-nuqqas ta' *data* storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huma indotti ebda aberrazzjoni kromożomika strutturali u effett dannuż ieħor minn solvent/veikolu atipiku magħżul, għandu jsir studju inizjali biex tiġi stabbilita l-aċċettabbiltà tal-kontroll bis-solvent/bil-veikolu.

Kontrolli pożittivi

16. Dejjem għandhom jintużaw annimali tal-kontroll pożittiv konkorrenti sakemm il-laboratorju ma jkunx wera profiċjenza fit-twettiq tat-test u jkun uża t-test bħala rutina fl-imgħoddi riċenti (eż. matul l-aħħar 5 snin). Meta ma jkunx hemm grupp tal-kontroll pożittiv konkorrenti inkluż, il-kontrolli tal-punteġġ (lametti fissi u mhux imlewnin) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Dawn jistgħu jinkisbu billi fl-ikklassifikar tal-istudju jiddaħħlu kampjuni ta' riferiment xierqa li nkisbu u nħażnu minn esperiment tal-kontroll pożittiv separat imwettaq b'mod perjodiku (eż. kull 6-18-il xahar) fil-laboratorju fejn isir it-test; pereżempju, matul l-ittestjar tal-profiċjenza u fuq bażi regolari wara, fejn ikun hemm bżonn.

17. Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom jipproduċu b'mod affidabbli żieda identifikabbli fil-frekwenzi taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fuq il-livelli spontanji. Id-dożi tal-kontroll pożittiv għandhom jingħażlu biex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tal-kampjuni kodifikati lil min jaqrahom. Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv.

▼M8

Tabella 1

Eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv

Sustanzi [Nru CAS] (nru ta' riferiment)
Ċiklofosfamid (monoidrat) [Nru CAS 50-18-0 (Nru CAS 6055-19-2)] (9)
Ċikloessilamina [Nru CAS 108-91-8]
Mitomiċina C [Nru CAS 50-07-7] (6)
Akrilammid monomeriku [CAS 79-06-1] (10)
Trietilenmelamina [CAS 51-18-3] (8)

Kontrolli negattivi

18. L-annimali tal-kontrolli negattivi, trattati b'solvent jew b'veikolu waħdu, u mill-bqija trattati bl-istess mod bħall-gruppi tal-kura, għandhom ikunu inklużi għal kull ħin tal-kampjunar. Fin-nuqqas ta' *data* tal-kontroll storika jew ippubblikata li turi li ma kien indott ebda aberrazzjoni kromożomika jew effett ta' tħassir ieħor mis-solvent/mill-veikolu magħżul, l-annimali tal-kontroll mhux trattati għandhom ikunu inklużi wkoll għal kull ħin tal-kampjunar biex tiġi stabbilita aċċettabbiltà tal-kontroll tal-veikolu.

PROĊEDURA

Numru ta' annimali

19. Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju għandhom jiġu stabbiliti bl-għan li tal-anqas jiġu pprovduti ħames annimali rġiel għal kull grupp. Dan in-numru ta' annimali għal kull grupp jitqies li hu biżżejjed biex tiġi pprovduta saħħa statistika adegwata (jiġifieri ġeneralment ikun jista' jiġi individwat tal-anqas irdoppjar fil-frekwenza tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi meta l-livell tal-kontroll negattiv ikun 1,0 % jew akbar bi probabbiltà ta' 80 % f'livell ta' sinifikat ta' 0,05) (3) (11). Bħala gwida għar-rekwiżiti tipiċi massimi tal-annimali, studju f'żewġ waqtiet tal-kampjunar bi tliet gruppi tad-doża u grupp tal-kontroll negattiv konkorrenti, flimkien ma' grupp tal-kontroll pożittiv (kull wieħed imsawwar minn ħames annimali għal kull grupp), ikun jeħtieġ 45 annimal.

Skeda tat-trattament

20. Normalment is-sustanzi kimiċi tat-test jingħataw darba (jiġifieri bħala trattament wieħed); jistgħu jintużaw reġimi tad-doża oħra, dment li ma jkunux xjentifikament ġustifikati.

21. Fil-grupp tal-ogħla doża jittieħdu żewġ kampjuni wara t-trattament. Ladarba l-ħin meħtieġ għall-bidu u l-metaboliżmu tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test kif ukoll l-effetti tagħha fuq il-kinetika taċ-ċikli taċ-ċelloli jistgħu jaffettwaw il-ħin ottimali għall-individwar tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi, jintużaw ħin tal-kampjunar wieħed bikri u ħin ieħor tard madwar 24 u 48 siegħa wara t-trattament. Għal doża li mhumiex l-ogħla doża, għandu jittieħed ħin tal-kampjunar bikri ta' 24 siegħa (anqas jew daqs il-ħin taċ-ċiklu taċ-ċelloli ta' spermatogonji B u b'hekk tiġi ottimizzata l-probabbiltà ta' għoti ta' punteġġ għall-ewwel metafażijiet ta' wara t-trattament) wara t-trattament, sakemm ma jkunx magħruf li hemm ħin ieħor tal-kampjunar aktar xieraq u ġustifikat.

22. Jistgħu jintużaw ħinijiet oħra tal-kampjunar. Pereżempju, fil-każ ta' sustanzi kimiċi li jeħilsu effetti indipendenti mis-S, ħinijiet tal-kampjunar aktar bikrin (jiġifieri anqas minn 24 siegħa) jistgħu jkunu xierqa.

▼M8

23. Jista' jintuża reġim ta' trattament ta' doża ripetuta, bħal flimkien ma' test fuq punt ta' tmiem ieħor li juża perjodu ta' amministrazzjoni ta' 28 jum (eż., TM B.58); madankollu, gruppi ta' annimali addizzjonali jkunu meħtieġa jakkomodaw ħinijiet tal-kampjunar differenti. Għalhekk, l-idoneità ta' skeda bħal din trid tiġi aġġustata xjentifikament skont kull każ individwali.

24. Qabel l-ewtanażja, l-annimali jiġu injettati intraperitonalment b'doża xierqa ta' sustanza kimika li twaqqaf l-metafaži (eż. Colcemid® jew kolkičina). Wara dan, jittieħed kampjun mill-annimali f'intervalli xierqa. Għall-ġrieden u għall-firien, dan l-intervall hu ta' madwar 3 - 5 sigħat.

Livelli tad-doża

25. Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda *data* xierqa diġà disponibbli biex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jridu jintużaw fl-istudju ewlieni, skont ir-rakkomandazzjonijiet għat-twettiq ta' studji ta' individwazzjoni tad-doża (26). Dan l-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala d-doża li tinduċi effetti tossiċi ħfief b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, imġiba jew reazzjonijiet anormali, dipressjoni minuri tal-piż tal-ġisem jew ċitotossiċità tas-sistema ematopoetika) iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigħ, ta' tbatija jew ta' diffikultà li jeħtieġu ewtanażja tal-annimali (27).

26. L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fiċ-ċelloli spermatogoni (eż. tnaqqis fil-proporzjon bejn mitożijiet spermatogoni sal-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi). Dan it-tnaqqis ma għandux jaqbeż il-50 %).

27. Is-sustanzi kimiċi tat-test b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi mhux tossiċi baxxi (bħal ormoni u mitoġeni), u sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni ta' proprjetajiet tossikokinetiċi jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' tfassil tad-dożi u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

28. Biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju sħiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv (paragrafu 18) u tal-anqas tliet livelli ta' dożi ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda b'mhux akbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċix tossiċità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-*data* eżistenti, l-ogħla doża għal amministrazzjoni waħda għandha tkun ta' 2 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tossiċità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom idealment ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew ebda tossiċità. Meta tiġi osservata tossiċità tat-tessut fil-mira (jiġifieri testikoli) fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, hu rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'dożi mhux tossiċi. Studji li jkollhom l-għan li jikkaratterizzaw iktar bis-sħiħ l-informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża jistgħu jeħtieġu gruppi tad-doża addizzjonali. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn rekwiżiti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw. Jekk is-sustanza kimika tat-test tipproduċi tossiċità, għandhom jintgħażlu d-doża limitu flimkien ma' żewġ dożi inferjuri (kif deskritti aktar 'il fuq). Id-doża limitu għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew aktar hi ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, u għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' anqas minn 14-il jum id-doża limitu hi ta' 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum.

▼M8

Amministrazzjoni tad-doża

29. Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħażlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-teħid man-nifs, jew b'impjant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħażel biex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut fil-mira. L-injezzjoni intraperitoneali normalment ma tkunx rakkomandata sakemm ma tkunx xjentifikament ġustifikata peress li normalment ma tkunx rotta fiżjoloġikament rilevanti ta' esponiment tal-bniedem. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew fl-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wieħed, wieħed għandu joqgħod attent li l-ħin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u l-kampjunar ikun biżżejjed biex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (ara l-paragrafi 33). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew b'injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun ta' aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża massimu ta' 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi akbar minn dan (jekk ikunu permessi mil-leġiżlazzjoni dwar it-trattament xieraq tal-annimali) għandu jkun iġġustifikat. Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

Osservazzjonijiet

30. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrin jidhru l-aktar l-effetti antiċipati. Tal-inqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju, tal-anqas darba fil-ġimgħa matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-fażi tal-ewtanażja. Fi studji twal tal-anqas ġimgħa, il-kejlijiet tal-konsum tal-ikel għandhom isiru tal-anqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-anqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanizzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (13).

Preparazzjoni tal-kromożomi

31. Eżatt wara l-ewtanażja, is-sospensjonijiet taċ-ċelloli ġerminali jinkisbu minn testikola waħda, jew mit-tnejn, esposti għal soluzzjoni ipotonika u ffissati skont il-protokolli stabbiliti (eż. (2) (14) (15). Imbagħad iċ-ċelloli jitferrxu fuq il-lametti u jitlewnu (16) (17). Il-lametti kollha għandhom ikunu kodifikati biex l-identità tagħhom ma tkunx disponibbli għal min jiggradahom.

Analiżi

32. Tal-anqas 200 metafaži mifruxa sew għandhom jiġu ggradati għal kull annimal (3) (11). Jekk il-frekwenza tal-kontroll negattiv storiku tkun < 1 %, aktar minn 200 ċellola/annimal għandhom jiġu gradati biex tiżdied is-saħħa statistika (3). Għandhom jintużaw metodi ta' tilwin li jippermettu l-identifikazzjoni taċ-ċentromeru.

33. Aberrazzjonijiet tat-tip kromożomiku u kromatidiku għandhom jiġu reġistrati għalihom u jiġu klassifikati skont is-sottotipi (ksur, skambji). Id-diskrepanzi għandhom jiġu reġistrati, iżda mhux kunsidrati, meta jiġi determinat jekk sustanza kimika tinduċix żidiet sinifikanti fl-inċidenza ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi. Il-proċeduri użati fil-laboratorji għandhom jiżguraw li l-analiżi tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi ssir minn persuni mħarrġa kif

▼M8

suppost fl-għoti ta' punteġġ. Fid-dawl tal-fatt li l-proċeduri ta' preparazzjoni tal-lametti spiss jirriżultaw fil-ksur ta' sehem mill-metafażijiet li jirriżulta fit-telf ta' kromożomi, iċ-ċelloli li jingħataw punteġġ għandu jkun fihom għadd ta' ċentromeri ta' mhux inqas minn $2n \pm 2$, fejn n hi n-numru aplojdi ta' kromożomi għal dik l-ispeċi.

34. Għalkemm l-iskop tat-test hu li jindividwa aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali, importanti li jiġu reġistrati l-frekwenzi ta' ċelloli poliplojdi u ta' ċelloli bi kromożomi endoreduplikati meta jiġu osservati dawn l-avvenimenti (ara l-Paragrafu 44).

DATA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

35. *Data* dwar l-annimali individwali għandha tiġi ppreżentata f'forma ta' tabelli. Għal kull annimal għandhom jiġu evalwati n-numru ta' ċelloli b'aberrazzjoni(jiet) kromożomika/ċi strutturali u n-numru ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi għal kull ċellola. L-aberrazzjonijiet tat-tip kromatidiku u kromożomiku klassifikat skont is-sottotipi (ksur, skambji) għandhom jiġu elenkati b'mod separat bin-numri u bil-frekwenzi tagħhom għall-gruppi sperimentali u tal-kontroll. Id-diskrepanzi jiġu reġistrati b'mod separat. Il-frekwenza tad-diskrepanzi tiġi rapportata iżda, ġeneralment, ma tkunx inkluża fl-analiżi tal-frekwenza totali ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali. Il-perċentwal ta' poliplojdija u ta' ċelloli bi kromożomi endoreduplikati jiġi rapportat meta jiġi osservat.

36. Għandha tiġi rrapportata d-*data* dwar it-tossiċità u s-sinjali kliniċi (skont il-Paragrafu 30).

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

37. Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabbiltà ta' test.

— Il-kontroll negattiv konkorrenti hu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll negattiv, li ġeneralment ikunu mistennija jkunu $> 0\ \%$ u $\leq 1{,}5\ \%$ taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi, u u mad-*data* storika tal-kontroll tal-laboratorju jekk tkun disponibbli (ara l-Paragrafi 10 u 18).

— Il-kontrolli pożittivi konkorrenti jinduċu risponsi li jkunu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll pożittiv, jew mal-bażi tad-*data* storika tal-kontroll pożittiv tal-laboratorju, jekk disponibbli, u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-Paragrafi 17, 18).

— Ġew analizzati numri adegwati ta' ċelloli u ta' dożi (ara l-Paragrafi 28 u 32).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-Paragrafi 25 u 26.

38. Jekk jiġu osservati mitożi u mejożi, il-proporzjon ta' mitożijiet spermatogoni għall-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi għandu jkun determinat bħala kejl taċ-ċitotossiċità għall-annimali trattati u tal-kontroll negattiv kollha f'kampjun totali ta' 100 ċellola diviżorja għal kull annimal. Jekk tiġi osservata mitożi biss, l-indiċi mitotiku għandu jiġi determinat f'tal-anqas 1 000 ċellola għal kull annimal.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

39. Tal-inqas tliet gruppi tad-doża kkurati għandhom jiġu analizzati biex tiġi pprovduta biżżejjed *data* għal analiżi tar-rispons għad-doża.

▼**M8**

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva biċ-ċar jekk:

— tal-anqas waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;

— iż-żieda hi relatata mad-doża tal-anqas f'ħin tal-kampjunar wieħed; u,

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mill-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson) jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi fiċ-ċelloli spermatogoni tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mid-dokumentazzjoni (11) (18). It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal bħala l-unità sperimentali.

41. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva biċ-ċar jekk:

— l-ebda waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;

— ma jkun hemm ebda żieda relatata mad-doża f'xi kundizzjoni sperimentali; u,

— ir-riżultati kollha jaqgħu fi ħdan il-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson), jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li mhix kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli spermatogoni tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mid-dokumentazzjoni (11) (18). Riżultat negattiv ma jeskludix il-possibbiltà li s-sustanza kimika tista' tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'fażijiet tal-iżvilupp aktar tard mhux studjati, jew mutazzjonijiet tal-ġeni.

42. Ma hemm l-ebda ħtieġa għal verifika ta' rispons pożittiv jew negattiv ċar.

43. Jekk ir-rispons ma jkunx negattiv jew pożittiv b'mod ċar, u bħala għajnuna għall-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda dgħajfa jew ambigwa), id-*data* għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri li jużaw id-*data* sperimentali eżistenti, bħal kunsiderazzjoni ta' jekk ir-riżultat pożittiv jaqax barra mill-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll negattiv, jew ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (19).

44. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u għaldaqstant jiġi konkluż bħala ekwivoku.

45. Żieda fin-numru ta' ċelloli poliplojdi tista' tindika li s-sustanza kimika tat-test għandha l-potenzjal li tinibixxi l-proċessi mitotiċi u tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi numeriċi (20). Żieda fin-numru ta' ċelloli bi kromożomi endoreduplikati tista' tindika li s-sustanza kimika tat-test għandha l-potenzjal li tinibixi progress fiċ-ċiklu taċ-ċelloli (21) (22), li hu mekkaniżmu differenti ta' induzzjoni ta' tibdiliet kromożomiċi numeriċi mill-inibizzjoni tal-proċessi mitotiċi (ara l-Paragrafu 2). Għaldaqstant, l-inċidenza ta' ċelloli poliplojdi u ċelloli bi kromożomi endoreduplikati għandha tiġi reġistrata b'mod separat.

▼M8

Rapport tat-test

46. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sommarju.

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-mezz.

— il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-teħid man-nifs;

— id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż. l-istabbiltà, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

L-annimali tat-test:

— l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla;

— l-għadd u l-età tal-annimali,

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-metodu għall-identifikazzjoni unika tal-annimali

— għal studji fuq terminu qasir: il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— *data* tal-kontrolli pożittivi u negattivi (veikolu/solvent);

▼**M8**

— *data* minn studju għat-tiftix tal-medda, jekk ikun sar;

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— raġuni prinċipali għall-ħinijiet tas-sagrifiċċju;

— metodi għall-kejl tat-tossiċità tal-annimali, inklużi, fejn disponibbli, l-analiżijiet istopatoloġiċi jew ematoloġiċi u l-frekwenza li biha saru l-osservazzjonijiet u ttieħdu l-piżijiet tal-ġisem tal-annimali;

— il-metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laħqet it-tessut fil-mira, jew iċ-ċirkolazzjoni ġenerali, jekk jinkisbu riżultati negattivi;

— id-doża proprja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet;

— il-metodu tal-ewtanażja;

— il-metodu tal-analġeżija (meta tintuża)

— il-proċeduri għall-iżolament tat-tessuti;

— l-identità tas-sustanza kimika li twaqqaf il-metafaża, il-konċentrazzjoni tagħha u d-durata tat-trattament;

— il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti;

— il-kriterji għall-ikklassifikar tal-aberrazzjonijiet;

— in-numru ta' ċelloli analizzati għal kull annimal;

— kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Ir-riżultati:

— il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;

— il-piżijiet tal-ġisem u tal-organi matul is-sagrifiċċju (jekk jintużaw diversi trattamenti, il-piżijiet tal-ġisem meħuda matul ir-reġim tat-trattament);

— sinjali ta' tossiċità;

— indiċi mitotiku;

— il-proporzjon ta' ċelloli tal-mitożi spermatogoni għall-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi, jew evidenza oħra ta' esponiment għat-tessut fil-mira;

— it-tip u n-numru ta' aberrazzjonijiet, mogħtija separatament għal kull annimal;

— in-numru totali ta' aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;

▼**M8**

— in-numru ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;

— l-analiżijiet statistiċi u l-metodi applikati;

— *data* konkorrenti tal-kontroll negattiv;

— *data* storika tal-kontroll negattiv b'meded, b'medji, b'devjazzjonijiet standard, u b'intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (fejn disponibbli), jew *data* storika ppubblikata tal-kontroll negattiv użata għall-aċċettabbiltà tar-riżultati tat-test;

— *data* konkorrenti tal-kontroll pożittiv;

— tibdiliet fil-plojdija, inklużi l-frekwenzi ta' ċelloli poliplojdi u/jew endoreduplikati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariġi

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Fi: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt u J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. u Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. u de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Fi: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Fi: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. u Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., u Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., u Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. u Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. u Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Parigi.

(14) Yamamoto, K. u Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. u Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., u Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. u Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, Fi: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Report. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.u Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays fi: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. u Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. u Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. u Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼M8

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Anewplojdija: kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Ċentromeru: Reġjun(i) ta' kromożomu li miegħu huma assoċjati fibri rqaq waqt id-diviżjoni taċ-ċellola, li jippermettu l-moviment b'ċertu ordni ta' kromożomi sekondarji għall-poli ta' ċelloli sekondarji.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

Diversità tal-kromożomi: diversità tal-forom tal-kromożomi (eż. metaċentriċi, akroċentriċi, eċċ) u d-daqsijiet.

Aberrazzjoni tat-tip kromatidiku: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-ġdid bejn kromatidi.

Aberrazzjoni tat-tip kromożomiku: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-ġdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

Klastoġenu: kwalunkwe sustanza kimika li tikkawża aberrazzjonijiet kromożomiċi f'popolazzjonijiet ta' ċelloli jew ta' organiżmi.

Vojt: leżjoni akromatika iżgħar mill-wisa' ta' kromatid wieħed, u b'misallinjament minimu tal-kromatidi.

Ġenotossiċi: terminu ġenerali li jkopri t-tipi kollha ħsara lid-DNA jew lill-kromożomi, inklużi ksur, tħassiriet, addotti, modifiki u konnessjonijiet tan-nukleotidi, riarranġamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew ħsara fil-kromożomi stabbli.

Indiċi mitotiku (MI): il-proporzjon ta' ċelloli fil-metafażi diviż bin-numru totali ta' ċelloli osservati f'popolazzjoni ta' ċelloli; indikazzjoni tal-livell ta' profilerazzjoni ta' dik il-popolazzjoni.

Mitożi: diviżjoni tan-nukleu taċ-ċelloli li normalment jinqasam fi profażi, prometafażi, metafażi, anafażi u telofażi.

Mutaġeniku: jipproduċi tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Anormalità numerika: tibdil fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristku normali tal-annimali użati.

Poliplojdija: multiplu tan-numru aplojdu ta' kromożomi (*n*) minbarra n-numru diplojdu (jiġifieri 3*n*, 4*n* u l-bqija).

Aberrazzjoni strutturali: tibdil fl-istruttura tal-kromożomi li wieħed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku tal-istadju metafażiku tad-diviżjoni taċ-ċelloli, osservati bħala tħassir u biċċiet, skambji.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti u Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

▼M7

———————

▼B

B.25. **IT-TRASLOKAZZJONI TAL-ĠRIEDEN LI TITTIEĦED**

1. **METODU**

1.1 INTRODUZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2 DEFINIZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3 IS-SOSTANZI TAR-REFERENZA

Xejn.

1.4 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-test tat-traslokazzjoni tal-ġrieden li tittieħed jiskopri it-tibdiliet strutturali u numeriċi fil-kromożomi fiċ-ċelloli mammarji tal-mikrob kif rkuprati fil-wild ta' l-annimali ta' l-ewwel ġenerazzjoni. It-tipi ta' tibdiliet fil-kromożomi skoperti huma traslokazzjonijiet reċiproċi u, jekk il-wild femminili jkunu inklużi, it-telf tal-kromożom-X. Dawk li jġorru t-traslokazzjonijiet u il-femminili-XO juru fertilità mnaqqsa li hija użata biex jintgħażel il-wild ta' l-annimali F_1 għall-analiżi ċitoġenetika. L-isterilità kompleta hija kkawżata minn ċerti tipi ta' traslokazzjonijiet (X-autosome u tat-tip c-t). It-traslokazzjonijiet huma osservati ċitoġenetikament fiċ-ċelloli mejotiċi fil-metafaża tad-dijakinesi I ta' l-individwi maskili, jew irġiel F_1jew il-wild irġiel tan-nisa F_1. In-nisa-XO huma ċitoġenetikament identifikati mill-presenza ta' 39 kromożomi biss fil-mitosi tal-mudullun ta' l-għadma.

1.5 IL-KRITERJU TAL-KWALITÀ

Xejn.

1.6 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Il-preparazzjonijiet

Il-kimiċi tat-testijiet huma maħlulin fl-ilma tal-melħ isotoniku. Jekk ikunu insolubbli dawn jiġu maħlula jew sospiżi fil-vetturi adattati. Is-soluzzjonijiet ippreparati friski tal-kompost tat-test jiġu użati. Jekk vettura hija użata biex ikun faċilitat id-dosaġġ, dan m'għandu ifixkel il-kompost tat-test jew jipproduċi effetti tossiċi.

Il-mod ta' l-amministrazzjoni

Il-modi ta' l-amministrazzjoni huma normalment intubazzjoni orali jew injezzjoni fil-peritonew. Il-modi l-oħra ta' l-amministrazzjoni jistgħu jkunu adattati.

L-annimali ta' l-esperimentazzjoni

Biex ikunu faċilitat it-tagħmir u l-verifikazzjonijiet ċitoloġika dawn l-esperimenti huma magħmula fuq il-ġrieden. L-ebda razza ta' ġurdin m'hija meħtieġa. Madanakollu, il-medja tad-daqs tal-boton tar-razza għandu jkun aktar minn tmienja u għandu jkun relattivament kostanti.

Annimali b'saħħithom u maturi sesswalment huma użati.

▼B

In-numru ta' l-annimali

In-numru ta' l-annimali neċessarju jiddependi fuq il-frekwenza spontanja tat-traslokazzjoni u r-rata minima ta' induzzjoni meħtieġa għal riżultati pożittivi.

It-test huwa normalment magħmul permezz ta' analiżi tal-wild irġiel F_1. Minn ta' l-anqas 500 wild irġiel F_1 għandhom ikunu ttestjati għal kull grupp ta' doża. Jekk il-wild nisa F_1 ikunu nklużi, 300 raġel u 300 mara huma meħtieġa.

L-użu tal-kontrolli negattivi u pożittivi

Id-data adattata tal-kontroll, miksuba mill-kontroll konkorrenti u storiku għandha tkun disponibbli. Meta' r-riżultati pożittivi aċċettabbli tal-kontroll huma disponibbli mill-esperimenti magħmula riċentement fl-istess laboratorju dawn ir-riżultati jistgħu jkunu użati minflok il-kontroll konkorrenti pożittiv.

Il-livelli tad-doża

Il-livell wieħed tad-doża huwa ttestjat, normalment l-għola doża assoċċjata mal-produzzjoni ta' l-effetti tossiċi minimi, iżda mingħajr ma' taffettwa l-aġir riproduttiv jew is-soppravivenza. Biex tkun stabbilita relazzjoni doża/rispons żewġ dożi addizzjonali aktar baxxi huma meħtieġa. Għall-kimiċi li mhumiex tossiċi l-espożizzjoni għad-doża massima prattikabbli għandhu tkun użata.

Il-proċedura

It-trattament u t-tgħammir

Żewġ ċedoli ta' trattament huma disponibbli. L-amministrazzjoni waħda tas-sostanzi tat-test hija dik l-aktar użata. L-amministrazzjoniji tas-sostanza tat-test fuq sebat ijiem fil-ġimgħa għal 35 ġurnata tista' wkoll tkun użata. In-numri ta' tgħammiriet wara t-trattament huma kontrollati miċ-ċedola tat-trattament u għandu jiżgura li kull stadju taċ-ċellola tal-mikrobu trattata jkun meħud kampjun minnu. Fl-aħħar tal-perjodu tat-tgħammir in-nisa jiġu msakkra f'gaġeġ separati. Meta' n-nisa jwelldu, id-data, id-daqs tal-boton u s-sess tal-wild għandhom ikunu rekordjati. L-ulied irġiel kollha jinfatmu u l-ulied nisa huma mormija sakemm dawn ma jkunux inklużi fl-esperiment.

L-ittestjar għat-traslokazzjoniji eterożigożita'

Wieħed miż-żewġ metodi possibli huwa użat:

— L-ittestjar tal-fertilità ta' l-ulied F_1 u l-verifikazzjoni sussegwenti ta' dawk li possibilment iġorru t-traslokazzjoni bl-analiżi ċitoġenetika;

— L-analiżi ċitoġenetika ta' l-ulied irġiel F_1 kollha mingħajr għażla minn qabel bl-ittestjar tal-fertilità.

(a) L-ittestjar tal-fertilità

Il-fertilità mnaqqsa ta'l-individwu F_1 tista' tkun stabbilita bl-osservazzjoni tad-daqs tal-boton u/jew l-analiżi tal-kontenut ta' l-utru tas-sieħba nisa.

Il-kriterji biex tkun determinata l-fertilità normali u mnaqqsa għandhom ikunu stabbiliti għar-razza tal-ġrieden użata.

▼B

L-osservazzjoni tad-daqs tal-boton: L-irġiel F_1 li għandhom ikunu ttestjati għandhom ikunu maqfula ġo gaġeġ individwalment man-nisa jew mill-istess esperiment jew mill-kolonja. Il-gaġeġ huma spezzjonati kuljum mit-18 il-ġurnata wara t-tgħammir. Id-daqs tal-boton u s-sess ta' l-ulied F_2 huma rrekordjati mal-wild u l-botnijiet huma mormija minn dak in-nhar 'l hemm. Jekk l-ulied nisa F_1 ikunu ttestjati l-ulied F_2 tal-botnijiet iż-żgħar huma miżmuma għall-aktar testijiet. Dawk li jġorru t-traslokazzjoni u huma nisa huma verifikati bl-analiżi ċitoġenetika għal traslokazzjoni fi kwalunkwe mill-ulied irġiel tagħhom. In-nisa-XO huma magħrufa mill-bidla fir-rata mqabbla tas-sess fost l-ulied tagħhom minn 1:1 sa 1:2 irġiel *vs.* nisa. Fil-proċedura sekwenzali, l-annimali normali F_1 huma eliminati minn aktar testijiet jekk l-ewwel boton F_2 jilħaq jew jaqbeż il-valur normali predeterminat, altrimenti boton it-tieni jew it-tielet boton F_2 huwa osservat.

L-annimali F_1 li ma jistgħux ikunu klassifikati bħala normali wara l-osservazzjoni ta' sa tlett botnijiet F_2 jiġu jew ittestjati aktar bl-analiżi tal-kontenut ta' l-utru tas-sieħba nisa jew direttament soġġetti għall-analiżi ċitoġenetika.

L-analiżi tal-kontenut ta' l-utru: It-tnaqqis fid-daqs tal-boton ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni huwa minħabba għall-mewt embrijonika u għalhekk numru kbir ta' impjanti mejta huwa indikattiv tal-preżenza tat-traslokazzjoni fl-annimal li qed jiġi ttestjat. L-irġiel F_1 li għandhom ikunu ttestjati għandhom ikunu mgħammra ma' tnejn jew tlett nisa kull wieħed. Il-konċepiment huwa stabbilit bl-ispezzjoni ta' kuljum għall-plakek tal-vaġina kull filgħodu. In-nisa huma sakrifikati minn 14 sa 16 il-jum wara u l-impjanti ħajjin u mejtin fl-utri tagħhom huma rekordjati.

(b) L-analiżi ċitoġenetika

Il-preparazzjonijiet tat-test huma magħmula bit-teknika tat-tnixxif bl-arja. Dawk li jġorru t-traslokazzjoni huma identifikati bil-presenza ta' konfigurazzjonijiet multivalenti fil-metfaži dijakinesi I fl-ispermatoċiti primarji. L-osservazzjoni ta' mill-anqas żewġ ċelloli bl-assoċjazzjoni multivalenti tikkostitwixxi l-evidenza meħtieġa li l-annimal ittestjat huwa dak li jġorr it-traslokazzjoni.

Jekk l-ebda selezzjoni ta' tgħammir ma tkun saret l-irġiel F_1 kollha huma spezzjonati ċitoġenetikament. Il-minimu ta' 25 ċellola tal-metafaži dijakineži I għal kull raġel għandu jkun milħuq mikroskopikament. L-eżaminazzjoni tal-metafaži mitotika, fl-ispermatogonia jew l-għadma tal-mudullun, hija meħtieġa fl-irġiel F_1 bit-testikoli żgħar u t-tnaqqis mejotiku qabel id-dijakineži jew mis-sospetti tan-nisa F_1. Il-presenza ta' kromożoma twila u/jew qasira b'mod abnormali f'kull waħda mill-10 ċelloli hija evidenza għat-traslokazzjoni partikolari ta' l-irġiel sterili (tip c-t). Xi ftit traslokazzjonijiet X-awtosomatiċi li jikkawżaw l-isterilità fl-irġiel jistgħu biss ikunu identifikati bl-analiżi tal-gruppi tal-kromożomi mitotiċi. Il-presenza ta' 39 kromożomi fl-10 mitożi kollha hija evidenza għall-kundizzjoni XO f'mara.

2. **ID-DATA**

Id-data hija preżentata fil-forma ta' tabelli.

Il-medja tad-daqs tal-boton u r-rata tas-sess mit-tagħmir tal-ġenituri fit-twelid u l-ftiem huma rappurtati għal kull intervall ta' tgħammir.

▼B

Għall-assessjar tal-fertilità ta' l-annimali F_1, il-medja tad-daqs tal-boton ta' tgħammiriet kollha normali u d-daqsijiet tal-botnijiet individwali ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni F_1 huma preżentati. Għall-analiżi tal-kontenut ta' l-utru, il-medja tan-numru ta' l-impjanti ħajjin u mejtin ta' tgħammiriet normali u n-numri individwali ta' l-impjanti ħajjin u mejtin għal kull tgħammira ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni F_1 huma rappurtati.

Għall-analiżi ċitoġenetika tal-metafażi-dijakineżi I, in-numri tat-tipi tal-konfigurazzjonijiet multivalenti u n-numru totali taċ-ċelloli huma mniżżla għal kull wieħed li jġorr it-traslokazzjoni.

Għall-individwi F_1 sterili, in-numru totali tat-tgħammiriet u t-tul tal-perjodu tat-tgħammir huma rappurtati. Il-piż tat-testikoli u d-dettalji ta' l-analiżi ċitoġenetika huma mogħtija.

Għan-nisa XO, il-medja tad-daqs tal-boton, ir-rata tas-sess ta' l-ulied F_2 u r-riżultati ta' l-analiżi ċitoġenetika huma rappurtati.

Fejn ikunu possibli dawk li jġorru t-traslokazzjoni F_1 huma magħżula minn qabel bit-testijiet tal-fertilità, it-tabelli għandhom jinkludi l-informazzjoni fuq kemm minn dawn kienu konfermati eterożigoti tat-traslokazzjoni.

Id-data mill-kontrolli negattivi u l-esperimenti pożittivi tal-kontroll huma rappurtati.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1 IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandhu, jekk possibbli, jkun fih l-informazzjoni li ġejja:

— ir-razza tal-ġrieden, iż-żmien ta' l-annimali, il-piż ta' l-annimali trattati;

— in-numri ta' l-annimali ġenituri ta' kull sess fil-gruppi esperimentali jew kontrollati;

— il-kundizzjonijiet ta' l-ittestjar, id-deskrizzjoni dettaljata tat-trattament, il-livelli tad-doża, is-solventi, iċ-ċedola tat-tgħammir;

— in-numru u s-sess ta' l-ulied għal kull mara, in-numru u s-sess ta' l-ulied miżjud għall-analiżi tat-traslokazzjoni;

— il-ħin u l-kriterji għall-analiżi tat-traslokazzjoni;

— in-numru u d-deskrizzjoni dettaljata ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni, inkluża d-data tat-tgħammir u d-data tal-kontenut ta' l-utru, jekk applikabbli;

— il-proċeduri ċitoġeneticI u d-detallji ta' l-analiżi mikroskopika, preferibbilment bl-istampi;

— il-valutazzjoni statistika;

— id-diskussjoni tar-riżultati;

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

▼B

3.2 IL-VALUTAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **IR-REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

▼B

B.26. **EŻAMI TA' TOSSIĊITA ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻA GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊJI TA' ANNIMALI GERRIEMA**

1. **METODU**

Il-metodu għat-test tat-tossiċità orali sub-kronika huwa replika ta' l- OECD TG 408 (1998)

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kemikali, id-determinazzjoni tat-tossiċità orali sub-kronika bl-użu ta' dożi repetuti tista' ssir wara li l-informazzjoni tal-bidu fuq it-tossiċità tinkiseb mit-testijiet għat-tossiċità b'doża akuta jew repetuta għal 28 jum. L-istudju ta' 90 jum jipprovdi informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibbli li faċilment jista' jkun hemm minħabba espożizzjoni repetuta fuq perjodu imtawwal ta' żmien li jkopri l-maturazzjoni u t-tkabbir minn wara l-ftim sal-faża adulta. L-istudju se jipprovdi informazzjoni fuq l-effetti tossiċi prinċipali, jindika l-organi bħala mira u l-possibiltà ta' akkumulazzjoni, u jista' jipprovdi kalkolu ta' livell ta' espożizzjoni bl-ebda effett avvers osservat li jista' jintuża fl-għażla tal-livelli ta' doża għal studji kroniċi u biex jiġu stabbiliti kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni umana.

Il-metodu jkompli jenfasizza l-*endpoints* newroloġiċi u jagħti indikazzjoni ta' effetti immunoloġiċi u riproduttivi. Tingħata importanza wkoll għall-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi bil-galbu ta' l-annimali, sabiex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni. Dan l-istudju għandu jippermetti l-identifikazzjoni tal-kemikali bil-potenzjal li jikkawżaw effetti newrotossiċi, immunoloġiċi jew organi riproduttivi, li jistgħu jwasslu għal iktar investigazzjoni bir-reqqa.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Id-doża: huwa l-ammont tas-sustanza tat-test somministrat. Id-doża tissarraf f'piż (g, mg) jew f'piż tas-sustanza tat-test per unit tal-piż ta' l-annimal għat-test (eż. Mg/kg), jew f'konċentrazzjonijiet dietetiċi kostanti (ppm).

Id-dożaġġ: huwa terminu ġenerali li jikkomprendi d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

NOAEL: hija l-abbrevjazzjoni għal *no-observed-adverse-effect level* (livell bl-ebda effett avvers osservat) u huwa l-ogħla livel ta' doża fejn l-ebda sejbiet relatati ma' trattament avers ma ġew osservati.

1.3 PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza sperimentali għanda tkun somministrata kuljum, b'mod orali, f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' annimali sperimentali, doża waħda għal kull grupp għall-perjodu ta' 90 jum. Matul il-perjodu ta' somministrazzjoni, l-annimali huma osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju huma sottoposti għall-nekroskopija, u fi tmiem it-test dawk l-annimali li jsalvaw jiġu maqtula wkoll u sottoposti għan-nekroskopija.

▼B

1.4 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **It-tħejjija ta' l-annimali**

Għandhom jiġu użati annimali b'saħħithom li jkunu adattaw ruħhom għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 ijiem u li ma kienux suġġetti għal preoċeduri sperimentali qabel. L-annimali għat-test għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċje, ir-razza, is-sors, is-sess, il-piż u/jew l-età. L-annimali għandhom jiġu assenjati għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġġa jiġu minimizzati. Kull annimal għandu jkollu numru ta' identifikazzjoni.

1.4.2. **It-tħejjija tad-doża**

Is-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors jew fid-dieta jew fl-ilma għax-xorb. Il-metodu tas-somministrazzjoni orali jiddependi mill-għan ta' l-istudju, u mill-proprjetatjiet fiżiko/kimiċi tal-materjal għat-test.

Fejn hu meħtieġ, is-sustanza għat-test tinħall jew tiġi sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkomandabbli li, kull fejn hu possibbli, jiġi kkunsidrat l-ewwel l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni akwea, u wara tiġi kkunsidrata soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. Iż-żejt tal-qamħ) imbagħad bis-soluzzjoni possibbli f'mezzi oħra. Għall-mezzi li mhumiex ilma l-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa. L-istabilità tas-sustanza għat-test taħt il-kundizzjonijiet ta' somministrazzjoni għandha tiġi determinata.

1.4.3. **Il-Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.3.1. *L-annimali sperimentali*

L-ispeċi l-aktar preferit huwa l-far għalkemm jisgħu jintużaw speċi gerriema oħra, eż. Il-ġurdien. Għandhom jintużaw razez li huma komunement utilizzati fil-laboratorju ta' annimali żgħar u b'saħħithom. In-nisa qatt ma jkunu welldu u mhmiex tqal. Id-dożaġġ għandu jibda kemm jista' jkun malajr wara l-ftim u qabel ma l-annimali jkollhom disa' ġimgħat. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandux jaqbeż + 20 % tal-valur medju ta' kull sess. Fejn isir studju preliminari għal studju fit-tul fuq it-tossiċità kronika, annimali mill-istess razza u speċi għandhom jintużaw fiż-żewġ studji.

1.4.3.2. *In-numru u s-sess*

Mill-inqas 20 annimal (10 nisa u 10 rġiel) għandhom jintużaw f'kull livell tad-doża. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali ppjanati li jinqatlu qabel tmiem l-istudju. Skond l-għarfien ta' qabel dwar l-analogu kemikali jew magħluq, għandu jiġi kkunsidrat li jiżdied grupp satellita ta' għaxar annimali (ħamsa għal kull sess) fil-grupp ta' kontroll u ta' l-ogħla doża għall-osservazzjoni tar-riversibbiltà jew tal-persistenza ta' kwalunkwe effetti tossiċi, wara l-perjodu ta' trattament. It-tul ta' żmien ta' dan il-perjodu post-trattament għandu jiġi determinat b'mod xieraq skond l-effetti li ġew osservati.

▼B

1.4.3.3. *Il-livelli tad-doża*

Għandhom jintużaw mill-inqas tlett livelli ta' doża u kontroll wieħed, ħlief fejn hemm test ta' limitu (ara 1.4.3.4.). Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq ir-riżultati tad-doża repetuta jew ta' l-istudju tas-sejbiet tal-meddda u għandhom jikkunsidraw kwalunkwe data tossikoloġika u tossikokinetika disponibbli li teżisti għas-sustanza tat-test jew l-annimali relatati. Sakemm ma tkunx limitata min-natura fiżiko-kemikali jew l-effetti bijoloġiċi tas-sustanza għat-test, l-ogħla livell ta' doża għandu jiġi magħżul bl-għan li jġib it-tossiċità iżda mhux il-mewt jew it-tbatija qawwija. Sekwenza nieżla tal-livell ta' doża għandha tingħażel bl-għan li turi kwalunkwe rispons relata mad-dożaġġ u l-livell b'ebda effett avvers osservat (NOAEL) fl-iktar livell baxx tad-doża. Intervalli t*wo to four fold* huma ta' spiss ottimali biex jiġu ssettjati il-livelli neżlin tad-doża u ż-żieda tar-raba' grupp għat-test huwa ppreferut ta' spiss iktar mill-intervalli kbar (eż. iktar minn fattur ta' bejn wieħed u ieħor 6-10) bejn id-dożaġġi.

Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux trattat jew grupp ta' kontroll b'mezz jekk il-mezz jintuża fis-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test. Ħlief għat-trattament bis-sustanza għat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod ta' dawk fil-gruppi għat-test. Jekk jintuża l-mezz, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-mezz fl-ogħla volum użat. Jekk sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta u tikkawża dħul dietetiku mnaqqas, imbagħad grupp ta' kontroll li jkun ġie magħluf jista' jgħin jiddistingwu bejn tnaqqis minħabba l-palatabilità jew minħabba l-alterazzjonijiet tossikoloġiċi fil-mudell għattest.

Il-karatteristiċi tal-mezz u additivi oħra li ġejjin għandhom jiġu kkunsidrati kif xieraq: l-effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-retenzjoni tas-sustanza għat-test; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u x-xorb jew fuq l-istatus nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.4.3.4. *It-test tal-limitu*

Jekk test f'livell wieħed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/ġurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti b'avvers mhux osservat) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi relatati strutturalment, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika ħlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-ħtieġa li jiġi użat livell ogħla ta' doża.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Is-somministrazzjoni tad-doża**

L-annimali jingħataw id-dożaġġ bis-sustanza għat-test sebat ijiem kull ġimgħa għal perjodu ta' 90 jum. Kwalunkwe *regime* ta' dożaġġ ieħor, eż. Ħamest ijiem fil-ġimgħa, irid ikun ġustifikat. Meta s-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors, dan għandu jsir f'doża waħda bl-użu ta' tubu għall-istonku jew intubazzjoni *cannula* xierqa. Il-volum massimu tal-likwidu li jista' jiġi somministrat f'darba jiddependi mid-daqs ta' l-annimal. Il-volum m'għandux ikun iktar minn 1 ml/100g tal-piż tal-ġisem, ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet akwei fejn 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jintuża. Ħlief għal sustanzi korruživi jew ta' irritazzjoni, li normalment jiżvelaw effetti agħar b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tipi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni sabiex tiġura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

▼B

Għal dawk is-sustanzi somministrati permezz tad-dieta jew l-ilma għax-xorb huwa importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza għat-test involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza għat-test hija somministrata fid-dieta jew konċentrazzjoni dietetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal jistgħu jintużaw. L-użu alternattiv irid jiġi speċifikat. Għas-sustanza li tiġi somministrata bil-fors, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili kuljum, u aġġustata kif ikun meħtieġ sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Fejn qed jintuża studju ta' 90 jum bħala studju preliminarju għal dak li jtul dwar it-tossiċità kronika, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

1.5.2. **L-osservazzjonijiet**

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun mill-inqas ta' 90 jum. L-annimali fi grupp satellita li huma skedati għal *follow-up* ta' l-osservazzjonijiet għandhom jinżammu għal perjodu xieraq mingħajr trattament sabiex tidher il-persistenza ta', jew l-irkupru mill-effetti tossiċi.

L-osservazzjonijiet kliniċi ġenereali għandhom isiru mill-inqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin (ħinijiet) kuljum, waqt illi jiġi meqjus il-perjodu *peak* ta' l-effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni klinika ta' l-annimali għandha tiġi rrekordjata. Mill-inqas darbtejn kuljum, normalment fil-bidu u fi tmiem il-jum, l-annimali kollha jiġu spezzjonati għal sinjali ta' morbidità jew ta' mortalità.

Ta' l-inqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex ikun hemm lok għall-paraguni fi ħdan is-suġġett), u darba fil-ġimgħa wara dan, l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru għall-annimali kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa fejn jitpoġġew, preferebbilment f'arena standard u f'ħinijiet simili kull darba. Għandhom jiġu rrekordjati tajjeb, preferebbilment bl-użu ta' sistemi ta' mmarkar, definiti b'mod ċar mil-laboratorju għall-ittestjar. Għandu jsir sforz sabiex jiġi żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' l-osservazzjoni huma minimali. Is-sinjali nnutati għandhom jinkludu, iżda mhux ikunu limitati għalihom, it-tibdil fil-ġilda, fil-pil, fl-għajnejn, fil-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxija u ta' l-eskrementi u ta' l-attività awtonomika (eż. il-lakrimazzjoni, il- *pilo-erection*, id-daqs tal-pupill, is-sistema respiratorja mhux normali). It-tibdil fil-mixja, fil-pożizzjoni u r-rispons għall-imaniġġjar kif ukoll il-preżenza ta' ċaqliq kloniku jew toniku, l-isterjotipi (eż. *grooming* eċċessiv, tidwir tond repetittiv) jew imġiba stramba (eż. Awto-mutilazzjoni, il-mixi b'lura) għandhom jiġu rrekordjati wkoll (1).

Lejn tmiem il-perjodu ta' l-espożizzjoni u mhux qabel il-11-il ġimgħa, għandha ssir reattività sensorjali għal stimuli ta' tipi differenti (1) (eż. awditorjali, stimuli viżwali u *proprioceptive*) (2), (3), (4), il-valutazzjoni tas-saħħa tal-qabda (5) u l-valutazzjoni *motor activity* (6). Dettalji oħra fuq il-proċeduri li jistgħu jsegwu qegħdin fir-referenzi rispettivi. Madankollu, il-proċeduri alternattivi apparti dawk referenzjati jistgħu jintużaw ukoll.

L-osservazzjonijiet funzjonali magħmula lejn tmiem l-istudju jistgħu jithallew barra meta d-data fuq l-osservazzjonijiet funzjonali tista' tittieħed minn studji oħra u l-osservazzjonijiet kliniċi ta' kuljum ma wrew l-ebda deficits funzjonali.

▼B

Ħlief f'eċċezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu jitħallew barra wkoll għal gruppi li juru sinjali ta' tossiċità b'tali mod li jfixklu b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.

1.5.2.1. *Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/xorb*

L-annimali kollha għandhom jintiżnu mill-inqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ikel u tax-xorb għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza għat-test hija somministrata permezz ta' l-ilma għax-xorb, il-konsum ta' l-ilma għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa wkoll. Il-konsum ta' l-ilma jista' jitqies ukoll għal studji dietetiċi jew ta' ikel mogħti bil-fors li matulu l-attività tax-xorb tista' tiġi tinbidel.

1.5.2.2. *Il-ħematoloġija u l-Bijokemistrija Klinika*

Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn site imsemmija u maħżuna, jekk applikabbli, f'kundizzjonijiet xierqa. Fi tmiem il-perjodu għat-test, il-kampjuni jinġabru eżatti qabel jew bħala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali, u maħżuna f'kundizzjonijiet xierqa

L-eżaminazzjonijiet ħematoloġiċi li ġejjin għandhom isiru fi tmiem il-perjodu għat-test u meta kwalunkwe kampjuni tad-demm interim ikunu nġabru:*Haematocrit,* konċentrazzjoni ta' *haemoglobin,* l-għadd ta' l- *erythrocyte,* l-għadd totali u differenzjali tal-*leucocyte*, l-għadd tal- *platelet* u l-kejl tal-ħin/potenzjal tal-boċċi fid-demm.

Id-determinazzjonijiet tal-bijokemistrija klinika biex jinvestigaw effetti prinċipali tossiċi fit-tessuti u, speċifikament, l-effetti fuq il-kliewi u fuq il-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demm miksuba mill-annimali kollha eżatti qabel jew bħala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali (apparti ta' dawk li jinstabu qed imutu u/jew jinqatlu). B'mod simili għall-investigazzjonijiet ħematoloġiċi, jista' jsir it-teħid tal-kampjuni interim għat-testijiet bijokemikali kliniċi. Huwa rakkomandat is-sawm mal-lejl ta' l-annimali qabel it-teħid tal-kampjuni tad-demm ([1]). Id-determinazzjonijiet tal-plasma jew serum għandhom jinkludu is-sodju, il-putassa, il-glokożju, il-kolestorol totali, l-urea, in-nitroġenu fid-demm mill-urea, il-*creatinine*, il-proteini u l-albumin totali, u iktar minn żewġ enzimi li juru l-effetti hepatoċellulari (bħalma huma l-*alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase, u sorbitol dehydrogenase*). Il-kejl ta' enzimi addizzjonali (ta' oriġini epatika jew oħra) u aċidi tal-*bile* li jistgħu jipprovdu informazzjoni utli taħt ċerti ċirkostanzi, jista' jiġi nkluż ukoll.

B'għażla, id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina li ġejjin jistgħu jsiru waqt l-aħħar ġimgħa ta' l-istudju bl-użu tal-ġbir bil-ħin tal-volum ta' l-urina; l-apparenza, il-volum, l-*osmolality* jew gravità speċifika, pH, il-proteini, il-glukożju u d-demm/iċ-ċelloli tad-demm.

Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar tas-serum ta' ħsara ġenerali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet oħra li għandhom jitwettqu jekk il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza għat-test jistgħu, jew huma suspettati li jaffettwaw il-profili metaboliċi relatati jinkludu il-kalċju, il-fosforu, il-fasting triglycerides, l-ormoni speċifiċi, il-*methaemoglobin* u l-*cholinesterase*. Dawn iridu jiġu identifikati għall-kimiċi f'ċerti klassijiet jew fuq bażi ta' kull każ.

([1]) Għal numru ta' kejl fis-serum u fil-plasma, l-iktar għall-glukożju, is-sawm mal-lejl ikun iktar preferut. Ir-raġuni prinċipali għal din il-preferenza hi li l-varjabbiltà li qed tiżdied u li bla dubju se tirriżulta min-nuqqas ta' sawm, tgħatti l-effetti l-iktar moħbija u l-interpretazzjoni tkun iktar diffiċli. Min-naħa l-oħra, madankollu, is-sawm mal-lejl jista' jfixkel il-metaboliżmu ġenerali ta' l-annimali u, b'mod partikulari fl-istudji ta' l-għalf. Jista' jfixkel ukoll l-espożizzjoni ta' kuljum għas-sustanza tat-test. Jekk jiġi adottat is-sawm mal-lejl, id-determinazzjonijiet bijokemikali u kliniċi għandhom jitwettqu wara t-twettieq ta' l-osservazzjonijiet funzjonali ta' l-istudju.

▼B

Fuq kollox, hemm il-bżonn ta' attitudni flessibbli skond l-ispeċi u l-effett osservat u/jew mistenni mis-sustanza mogħtija.

Jekk id-data storika mhix adegwata, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-varjabbli ematoloġiċi u tal-bijokemistrija kliniċi għandhomx bżonn jiġu determinati qabel ma jibda d-dożaġġ u ġeneralment mhuwiex rakkomandabbli li din id-data tiġi ġġenerata qabel it-trattament (7).

1.5.2.3 *Nekropsija Grossa*

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu suġġetti għall-awtopsja sħiħa grossa ta' wara l-mewt li tinkludi eżaminazzjoni bir-reqqa tal-wiċċ tal-ġisem, l-orifiċi kollha, u l-kavitajiet tal-kranju, tat-toraċi u dawk addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-testi, l-*epididymides*, it-*thymus*, il-milsa, il-moħħ u l-qalb ta' l-annimali kollha (ħlief ta' dawk li jkunu qed imutu u/jew jiġu maqtula) għandhom jiġu trimmjati minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u għandhom ikunu mwieżna niedja malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex ma jinxfux.

It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni ħistopatoloġika maħsuba sussegwenti: il-feriti kbar kollha, il-moħħ (partijiet rappreżentattivi inklużi iċ-ċerebrum, iċ-ċerebelllum u l-*medulla/pons*), il-korda spinali (fi tliet livelli: ċevikali, *mid-thoracic* u *lumbar*) il-glandoli *pituitary, thyroid, parathyroid, thymus, oesophagus, salivary*, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inklużi l-*Peyer's patches*), il-fwied, il-frixa, kliewi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-trakea u l-pulmuni (ippreservati bl-inflazzjoni bil-*fixative* imbagħad bl-immersjoni), l-aorta, il-*gonads*, l-utru, l-organi sesswali aċċessorili, il-glandola mammarja femminili, il-prostata, il-buż-żieqa ta' l-urina, il-*gall bladder* (il-ġurdien), in-noduli limfatiċi (preferibbilment nodulu limfatiku wieħed li jkopri r-rotta ta' l-amministrazzjoni u oħra distanti mir-rotta ta' l-amministrazzjoni biex tkopri l-effetti sistematiċi), in-nerv periferali (*sciatic* jew *tibial*) preferebbilment viċin il-muskolu, u biċċa mill-mudullun (jew, *a fresh bone marrow aspirate*), il-ġilda u l-għajnejn (jekk ġew osservati xi tibdiliet waqt l-eżaminazzjonijiet oftalmoloġiċi). Is-sejbiet klinikali u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu li hemm bżonn jiġu eżaminati tessuti addizzjonali. Kwalunkwe organi li jistgħu jkunu organi-mira bbażati fuq il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza tat-test għandhom jiġu ppreservati.

1.5.2.4. *Il-ħispatoloġija*

Il-ħispatoloġija kompluta għandha titwettaq fuq l-organi u t-tessuti ppreservati ta' l-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doża għolja. Dawn l-eżaminazzjonijiet għandhom jiġu estiżi għall-annimali tal-gruppi ta' dożaġġ l-oħrajn ukoll, jekk it-tibdil relatat mat-trattament jiġi osservat fil-grupp ta' doża għolja.

1.5.2.5. Il-feriti grossi kollha għandhom jiġu eżaminati.

Meta jintuża grupp satellita il-ħistopatoloġija għandha ssir fuq it-tessuti u l-organi identifikati bħala li qed juru l-effetti fil-gruppi trattati.

▼B

DATA U RAPPORTAĠĠ

2.1. DATA

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali nstabu mejta waqt it-test jew li nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kwalunkwe mewt jew qtil uman, in-numru li juri sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż il-ħin ta' l-onset, it-tul, il-qawwa ta' kwalunkwe effetti tossiċi, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, it-tip ta' feriti u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip ta' ferita.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Is-sustanza għat-test:**

— In-natura fiżika, il-purità u il-proprjetajiet fiżiko-kemikali;

— Id-data ta' identifikazzjoni;

— Il-mezz (jekk inhu xieraq): il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz, jekk mhuwiex l-ilma.

2.2.2. **L-ispeċi għat-test:**

— l-ispeċi/is-silta użati;

— In-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— Is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, id-dieta eċċ.;

— Il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test

2.2.3. **Il-kundizzjonijiet għat-test:**

— Ir-*rationale* għall-għażla tal-livell tad-doża;

— Id-dettalji tat-tħejjija tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza għat-test, il-konċentrazzjoni miksuba u l-omoġeneità tat-tħejjija;

— id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— Id-dożi kif inhuma tabilħaqq (mg/kg piż tal-ġisem/jum), u l-fattur tal-konverżjoni mill-konċentrazzjoni tat-test għas-sustanza tad-dieta/l-ilma għax-xorb (ppm) għad-doża kif inhi tabilħaqq, jekk applikabbli;

— Id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma

2.2.4. **Ir-riżultati:**

— Il-piż tal-ġisem/it-tibdil fil-piż tal-ġisem;

— Il-konsum ta' l-ikel u ta' l-ilma jekk applikabbli;

— Id-data tar-rispons tossiku bis-sess u bil-livell tad-doża, inklużi s-sinjali tat-tossiċità;

▼B

— In-natura, il-qawwa u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (jekk humiex riversibbli jew le);

— Ir-riżultati ta' l-eżaminazzjoni oftalmoloġika;

— l-attività sensorjali, is-saħħa tal-qabda ta' l-id u l-valutazzjonijiet *motor activity;*

— it-testijiet ematoloġiċi bil-valuri *base-line* relevanti;

— it-testijiet tal-bijokemistrija klinika bil-valuri *base-line* relevanti;

— il-piż tal-ġisem terminali, il-piżijiet ta' l-organi u r-*ratios* tal-piż ta' l-organi u tal-ġisem;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet ħistopatoloġiċi kollha;

— Id-data ta' l-assorbiment jekk hi disponibbli;

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn hu xieraq;

Id-diskussjoni tar-riżultati;

Konklużjonijiet.

3.1. **REFERENZI**

IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233-236.

Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

Weingand K., Brown G., Hall R. *et al*. (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198-201.

▼B

B.27. **EŻAMI TA' TOSSIĊITÀ ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻI GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊI TA' ANNIMALI MHUX GERRIEMA**

1. **METODU**

Il-metodu għat-test tat-tossiċità orali sub-kronika huwa replika ta' l-OECD TG 409 (1998)

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kemikali, id-determinazzjoni tat-tossiċità orali sub-kronika bl-użu ta' dożi repetuti tista' ssir wara li l-informazzjoni tal-bidu fuq it-tossiċità tinkiseb mit-testijiet għat-tossiċità b'doża akuta jew repetuta għal 28 jum. L-istudju ta' 90 jum jipprovdi informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibbli li faċilment jista' jkun hemm minħabba espożizzjoni repetuta għal perjodu ta' tkabbir mgħaġġel sal-fażi adulta. L-istudju se jipprovdi informazzjoni fuq l-effetti tossiċi prinċipali, jindika l-organi bħala mira u l-possibiltà ta' akkumulazzjoni, u jista' jipprovdi kalkolu ta' livell ta' espożizzjoni bl-ebda effett avvers osservat li jista' jintuża fl-għażla tal-livelli ta' doża għal studji kroniċi u biex jiġu stabbiliti kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni umana

Dan il-metodu għat-test għandu jippermetti l-identifikazzjoni ta' l-effetti avversi minħabba l-espożizzjoni kemikali fl-ispeċi li mhumiex gerriema u għandu jintuża biss:

— fejn l-effetti osservati fi studji oħra jindikaw il-ħtieġa għal klarifikazzjoni/karatterizzazzjoni fit-tieni speċi, li mhix gerriema, jew

— fejn l-istudji tossikokinetiċi jindikaw li l-użu ta' speċi mhux gerriema speċifika hija l-iktar għażla relevanti għall-annimal tal-laboratorju, jew

— fejn raġunijiet speċifiċi oħra jiġġustifikaw l-użu ta' speċi li mhix gerriema.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-doża: huwa l-ammont tas-sustanza tat-test somministrat. Id-doża tissarraf f'piż (g, mg) jew f'piż tas-sustanza tat-test per unit tal-piż ta' l-annimal għat-test (eż. Mg/kg), jew f'konċentrazzjonijiet dieteticiċi kostanti (ppm).

Id-dożaġġ: huwa terminu ġenerali li jikkomprendi d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

NOAEL: hija l-abbrevjazzjoni għal *no-observed-adverse-effect level* (livell bl-ebda effett avvers osservat) u huwa l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet relatati ma' trattament avvers ma ġew osservati.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza għat-test għandha tiġi somministrata kuljum, b'mod orali, f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' annimali sperimentali, doża waħda għal kull grupp għall-perjodu ta' 90 jum. Matul il-perjodu ta' somministrazzjoni, l-annimali huma osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju huma sottoposti għall-nekroskopija, u fi tmiem it-test dawk l-annimali li jsalvaw jiġu maqtula wkoll u sottoposti għan-nekroskopija.

▼B

1.4. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **L-għażla ta' l-ispeċi ta' l-annimali**

L-ispeċi li mhumiex gerriema l-aktar użat huwa l-kelb, li għandu jkun ta' razza definita. Il-*beagle* (kelb żgħir tal-kaċċa) jintuża ta' spiss. Jistgħu jintużaw ukoll speċi oħra, eż. ħanżir, u ħnieżer żgħar. Il-primati mhumiex rakkomandabbli u l-użu tagħhom għandu jkun ġustifikat. Għandhom jintużaw annimali żgħażagħ u b'saħħithom, u fil-każ tal-kelb, id-dożaġġ għandu jibda idealment mill-età ta' erba' sa sitt xhur u mhux aktar tard minn disa' xhur. Meta jsir studju preliminari għal dak iktar fit-tul dwar it-tossiċità kronika, l-istess speċi/razza għandha tintuża fiż-żewġ studji.

1.4.2. **It-tħejjija ta' l-annimali**

Għandhom jiġu użati annimali b'saħħithom li jkunu adattaw ruħhom għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju u li ma kinux suġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. It-tul ta' żmien ta' l-adattament jiddependi fuq l-ispeċi magħżula u s-sors tagħhom. Huma rakkomandati mill-inqas 5 ijiem għall-klieb jew ħanżir tar-razza li ġejjin minn kolonja residenti u mill-inqas ħmistax għal dawk l-annimali li ġejjin minn sorsi esterni. L-annimali għat-test għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċje, ir-razza, is-sors, is-sess, il-piż u/jew l-età. L-annimali għandhom jiġu assenjati bl-addoċċ għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġġa jiġu minimizzati. Kull annimal għandu jkollu numru ta' identifikazzjoni

1.4.3. **It-tħejjija tad-doża**

Is-sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta jew fl-ilma għaxxorb, permezz ta' l-għalf mogħti bil-fors jew fil-kapsuli. Il-metodu tas-somministrazzjoni orali jiddependi mill-għan ta' l-istudju, u mill-proprjetatjiet fiżiko/kimiċi tal-materjal għat-test.

Fejn hu meħtieġ, is-sustanza għat-test tinħall jew tiġi sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkomandabbli li, kull fejn hu possibbli, jiġi kkunsidrat l-ewwel l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni akwea, u wara tiġi kkunsidrata soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. Iż-żejt tal-qamħ) imbagħad bis-soluzzjoni possibbli f'mezzi oħra. Għallmezzi li mhumiex ilma l-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa. L-istabilità tas-sustanza għat-test taħt il-kundizzjonijiet ta' somministrazzjoni għandha tiġi determinata

1.5. IL-PROĊEDURA

1.5.1. **In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Mill-inqas 8 annimali (erba' nisa u erba' rġiel) għandhom jintużaw f'kull livell tad-doża. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali ppjanati li jinqatlu qabel tmiem l-istudju. Skond l-għarfien ta' qabel dwar is-sustanza jew l-analogu magħluq, għandu jiġi kkunsidrat li jiżdied grupp satellita ta' 8 annimali (erbgħa għal kull sess) fil-grupp ta' kontroll u ta' l-ogħla doża għall-osservazzjoni tar-riversibbiltà jew tal-persistenza ta' kwalunkwe effetti tossiċi, wara l-perjodu ta' trattament. It-tul ta' żmien ta' dan il-perjodu post-trattament għandu jiġi determinat b'mod xieraq skond l-effetti li ġew osservati.

▼B

1.5.2. **Id-dożaġġ**

Għandhom jintużaw mill-inqas tlett livelli ta' doża u kontroll wieħed, ħlief fejn hemm test ta' limitu (ara 1.5.3.). Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq ir-riżultati tad-doża repetuta jew ta' l-istudju tas-sejbiet tal-meddda u għandhom jikkunsidraw kwalunkwe data tossikoloġika u tossikokinetika disponibbli li teżisti għall-compound tat-test jew il-materjali relatati. Sakemm ma tkunx limitata min-natura fiżiko-kemikali jew l-effetti bijoloġiċi tas-sustanza għat-test, l-ogħla livell ta' doża għandu jiġi magħżul bl-għan li jġib it-tossiċità iżda mhux il-mewt jew it-tbatija qawwija. Sekwenza nieżla tal-livell ta' doża għandha tingħażel bl-għan li turi kwalunkwe rispons relata mad-dożaġġ u l-livell b'ebda effett avvers osservat (NOAEL) fl-iktar livell baxx tad-doża. Intervalli two to four fold huma ta' spiss ottimali biex jiġu ssettjati il-livelli nieżlin tad-doża u ż-żieda tar-raba' grupp għat-test huwa ppreferut ta' spiss iktar mill-intervalli kbar (eż. iktar minn fattur ta' bejn wieħed u ieħor 6-10) bejn id-dożaġġi.

Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux trattat jew grupp ta' kontroll b'mezz jekk il-mezz jintuża fis-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test. Ħlief għat-trattament bis-sustanza għat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod ta' dawk fil-gruppi għat-test. Jekk jintuża l-mezz, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-mezz fl-ogħla volum użat. Jekk sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta u tikkawża dħul dietetiku mnaqqas, imbagħad grupp ta' kontroll li jkun ġie magħluf jista' jgħin biex jiddistingwu bejn tnaqqis minħabba l-palatabilità jew minħabba l-alterazzjonijiet tossikoloġiċi fil-mudell għattest.

Il-karatteristiċi tal-mezz u additivi oħra li ġejjin għandhom jiġu kkunsidrati kif xieraq: l-effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-retenzjoni tas-sustanza għat-test; l-effetti fuq il-proprjetajiet kemikali tas-sustanza għat-test u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u x-xorb jew fuq l-istatus nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.5.3. **It-test tal-limitu**

Jekk test f'livell wieħed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/ġurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi mhux osservati) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika ħlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-ħtieġa li jiġi użat livell ogħla ta' doża.

1.5.4. **Is-somministrazzjoni tad-doża**

L-annimali jingħataw id-dożaġġ bis-sustanza għat-test sebat ijiem kull ġimgħa għal perjodu ta' 90 jum. Kwalunkwe *regime* ta' dożaġġ ieħor, eż. Ħamest ijiem fil-ġimgħa, irid ikun ġustifikat. Meta s-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors, dan għandu jsir f'doża waħda bl-użu ta' tubu għall-istonku jew intubazzjoni *cannula* xierqa. Il-volum massimu tal-likwidu li jista' jiġi somministrat f'darba jiddependi mid-daqs ta' l-annimal. Normalment il-volum għandu jinżamm baxx kemm jista' jkun. Ħlief għal sustanzi korrużivi jew ta' irritazzjoni, li normalment jiżvelaw effetti agħar b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni sabiex tiżgura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

▼B

Għal dawk is-sustanzi somministrati permezz tad-dieta jew l-ilma għax-xorb huwa importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza għat-test involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza għat-test hija somministrata fid-dieta jew konċentrazzjoni dietetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal jistgħu jintużaw. L-użu alternattiv irid jiġi speċifikat. Għas-sustanza li tiġi somministrata bil-fors, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili kuljum, u aġġustata kif ikun meħtieġ sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Fejn qed jintuża studju ta' 90 jum bħala studju preliminarju għal dak li jtul dwar it-tossiċità kronika, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

1.5.5. **L-osservazzjonijiet**

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun mill-inqas ta' 90 jum. L-annimali fi grupp satellita li huma skedati għal *follow-up* ta' l-osservazzjonijiet għandhom jinżammu għal perjodu xieraq mingħajr trattament sabiex tidher il-persistenza ta', jew l-irkupru mill-effetti tossiċi.

L-osservazzjonijiet kliniċi ġenereali għandhom isiru mill-inqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin (ħinijiet) kuljum, waqt illi jiġi meqjus il-perjodu *peak* ta' l-effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni klinika ta' l-annimali għandha tiġi rrekordjata. Mill-inqas darbtejn kuljum, normalment fil-bidu u fi tmiem il-jum, l-annimali kollha għandhom jiġu spezzjonati għal sinjali ta' morbidità jew ta' mortalità.

Ta' l-inqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex ikun hemm lok għall-paraguni fi ħdan is-suġġett), u darba fil-ġimgħa wara dan, l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru għall-annimali kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa fejn jitpoġġew, preferebbilment f'arena standard u f'ħinijiet simili kull darba. Għandu jsir sforz sabiex jiġi żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' l-osservazzjoni huma minimali. Is-sinjali tat-tossiċità għandhom jiġu rrekordjati tajjeb, inklużi l-ħin ta' l-*onset,* il-grad u t-tul ta' żmien. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu, iżda mhux ikunu limitati għalihom, it-tibdil fil-ġilda, fil-pil, fl-għajnejn, fil-membrani mukuża, l-okkorrenza ta' tnixxija u ta' l-eskrementi u ta' l-attività awtonomika (eż. il-lakrimazzjoni, il- *pilo-erection*, id-daqs tal-pupill, attività respiratorja mhux normali). Bidliet fil-mixja, fil-pożizzjoni u r-rispons għall-imaniġġjar kif ukoll il-preżenza ta' ċaqliq kloniku jew toniku, l-isterjotipi (eż. *grooming* eċċessiv, tidwir tond repetittiv) jew imġiba stramba għandhom jiġu rrekordjati.

L-eżaminazzjoni oftalmoloġika, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir xieraq ekwivalenti, Għandha ssir qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u fi tmiem l-istudju, preferibbilment fl-annimali kollha iżda għallinqas fil-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll. Jekk ikun hemm tibdil fl-għajnejn relatat mat-trattament l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati.

1.5.5.1. *Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/xorb*

L-annimali kollha għandhom jintiżnu mill-inqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ikel u tax-xorb għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza għat-test hija somministrata permezz ta' l-ilma għax-xorb, il-konsum ta' l-ilma għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa wkoll. Il-konsum ta' l-ilma jista' jitqies ukoll għal studji dietetiċi jew ta' ikel mogħti bil-fors li matulu l-attività tax-xorb tista' tinbidel.

▼B

1.5.5.2. *Il-ħematoloġija u l-Bijokemistrija Klinika*

Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn site imsemmija u maħżuna, jekk applikabbli, f'kundizzjonijiet xierqa. Fi tmiem il-perjodu għat-test, il-kampjuni jinġabru eżatti qabel jew bħala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali.

Il-ħematoloġija, inklużi l-*haematocrit*, il-konċentrazzjoni ta' *haemoglobin*, l-għadd ta' l-*erythrocyte*, l-għadd totali u differenzjali tal-*leukocyte*, l-għadd tal-*platelet* u l-kejl ta' potenzjal għall-boċċi (*clotting*) bħalma hu l-ħin ta' l-iffurmar tal-boċċi, il-ħin tal-*prothrombin*, jew il-ħin tat-*thromboplastin* għandhom jiġu investigati fil-bidu ta' l-istudju, imbagħad jew f'intervalli ta' xhur jew f'nofs triq tal-perjodu tat-test u fl-aħħarnett fi tmiemu.

Id-determinazzjonijiet tal-bijokemistrija klinika biex jinvestigaw effetti prinċipali tossiċi fit-tessuti u, speċifikament, l-effetti fuq il-kliewi u fuq il-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demm miksuba mill-annimali fil-bidu, imbagħad f'intervalli ta' xhur jew f'nofs it-test u fl-aħħarnett fi tmiem il-perjodu tat-test. Iż-żoni tat-test li għandhom jiġu kkunsidrati huma l-bilanċ electrolyte, il-metaboliżmu tal- carbohydrate, u l-funzjoni tal-fwied u l-kliewi. L-għażla tat-testijiet speċifiċi tkun influwenzata mill-osservazzjonijiet ta' l-azzjoni tas-sustanza għattest. L-annimali għandhom ikunu sajmin għal perjodu xieraq għall-ispeċi u qabel it-teħid tal-kampjuni tad-demm. Id-determinazzjonijiet suġġeriti jinkludu l-kalċju, il-fosfru, il-klorur, is-sodju, il-potassju, il-glukosju swami, l-*alanine*, l-*aminotransferase*, l-*aspartate aminotransferase*, l-*ornithine decarboxylase*, il-*gamma glutamyl transpeptidase*, l-*urea nitrogen*, l-*albumin*, il-*blood creatinine*, it-total tal-*bilirubin* u t-total tal-kejl tas-*serum protein*.

Id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina għandhom isiru għal-linqas fil-bidu, imbagħad fin-nofs u fl-aħħarnett fi tmiem l-istudjubl-użu tal-ġbir bil-ħin tal-volum ta' l-urina. Id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina jinkludu l-apparenza, il-volum, l- *osmolality* jew il-gravità speċifika, il-pH, il-proteini, il-glukożju u d-demm/iċ-ċelloli tad-demm. Parametri addizzjonali jistgħu jintużaw fejn hu meħtieġ biex l-investigazzjoni ta' l-effett(i) osservat(i) tiġi estiża.

Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar ta' ħsara ġenerali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet oħra li jistgħu jkunu meħtieġa għal evalwazzjoni tossikoloġika adegwata jinkludu l-analiżi tal-lipidi, ta' l-ormoni, tal-bilanċ aċdu/-bażi, tal- methaemoglobin, u ta' l-inibizzjoni tal- cholinesterase. Il-bijokemistrija klinika addizzjonali tista' tintuża fejn hu meħtieġ sabiex l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati tiġi estiża. Dawn iridu jiġu identifikati għall-kimiċi f'ċerti klassijiet jew fuq bażi ta' kull każ.

Fuq kollox, hemm il-bżonn ta' attitudni flessibbli skond l-ispeċi u l-effett osservat u/jew mistenni mis-sustanza mogħtija.

1.5.5.3. *Nekropsija Grossa*

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu suġġetti għall-awtopsja sħiħa grossa ta' wara l-mewt li tinkludi eżaminazzjoni bir-reqqa tal-wiċċ tal-ġisem, l-orifiċi kollha, u l-kavitajiet tal-kranju, tat-toraċi u dawk addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied bil-*gall bladder*, il-kliewi, l-adrenali, it-testi, l-*epididymides*, l-*ovaries,* l-utru, it-*thyroid* (bil- *parathyroids*) it-*thymus*, il-milsa, il-moħħ u l-qalb ta' l-annimali kollha (ħlief ta' dawk li jkunu qed imutu u/jew jiġu maqtula) għandhom jiġu trimmjati minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u għandhom ikunu mwieżna niedja malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex ma jinxfux.

▼B

It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni ħistopatoloġika maħsuba sussegwenti: il-feriti kbar kollha, il-moħħ (partijiet rappreżentattivi inklużi iċ-ċerebrum, iċ-ċerebelllum u l-*medulla/pons*), il-korda spinali (fi tliet livelli: ċervikali, *mid-thoracic* u *lumbar*) il-glandoli tal-*pituitary,* l-għajnejn, il-glandoli tat-*thyroid,* tal-*parathyroid,* tat-*thymus,* ta l-*oesophagus,* u dawk *salivary*, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inklużi l- *Peyer's patches*), il-fwied, il-*gall bladder,* il-frixa, kliewi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-trakea u l-pulmuni, l-aorta, il-*gonads*, l-utru, l-organi sesswali aċċessorili, il-glandola mammarja femminili, il-prostata, il-bużżieqa ta' l-urina, in-noduli limfatiċi (preferibbilment nodulu limfatiku wieħed li jkopri r-rotta ta' l-amministrazzjoni u oħra distanti mir-rotta ta' l-amministrazzjoni biex tkopri l-effetti sistematiċi), in-nerv periferali (*sciatic* jew *tibial*) preferebbilment viċin il-muskolu, u biċċa mill-mudullun (u/jew, *a fresh bone marrow aspirate*) u l-ġilda. Is-sejbiet klinikali u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu li hemm bżonn jiġu eżaminati tessuti addizzjonali. Kwalunkwe organi li jistgħu jkunu organi-mira bbażati fuq il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza tat-test għandhom jiġu ppreservati.

1.5.5.4. *Il-ħispatoloġija*

Il-ħispatoloġija kompluta għandha titwettaq fuq l-organi u t-tessuti ppreservati ta'għallinqas l-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doża għolja. L-eżaminazzjoni għandha tiġi estiża għall-annimali tal-gruppi ta' dożaġġ l-oħra, jekk it-tibdil relatat mat-trattament jiġi osservat fil-grupp ta' doża għolja.

Il-feriti grossi kollha għandhom jiġu eżaminati

Meta jintuża grupp satellita il-ħistopatoloġija għandha ssir fuq it-tessuti u l-organi identifikati bħala li qed juru l-effetti fil-gruppi trattati.

2. DATA U RAPPORTAĠĠ

2.1. DATA

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li nstabu mejta waqt it-test jew li nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kwalunkwe mewt jew qtil uman, in-numru li juri sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż il-ħin ta' l-*onset*, it-tul, il-qawwa ta' kwalunkwe effetti tossiċi, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, it-tip ta' feriti u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip ta' ferita.

Meta huwa applikabbli, ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' statistika xieraq u ġeneralment aċċettat. Il-metodi statistiċi u d-data li trid tiġi analizzata għandha tingħażel waqt id-disinn ta' l-istudju.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼B

2.2.1. **Is-sustanza għat-test:**

— In-natura fiżika, il-purità u il-proprjetajiet fiżiko-kemikali;

— Id-data ta' identifikazzjoni;

— Il-mezz (jekk inhu xieraq): il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz, jekk mhuwiex l-ilma.

2.2.2. **L-ispeċi għat-test:**

— l-ispeċi/is-silta użati;

— In-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— Is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, id-dieta eċċ.;

— Il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

2.2.3. **Il-kundizzjonijiet għat-test:**

— Ir-*rationale* għall-għażla tal-livell tad-doża;

— Id-dettalji tat-tħejjija tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza għat-test, il-konċentrazzjoni; miksuba u l-omoġeneità tat-tħejjija;

— id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— Id-dożi kif inhuma tabilħaqq (mg/kg piż tal-ġisem/jum), u l-fattur tal-konverżjoni mill-konċentrazzjoni tat-test għas-sustanza tad-dieta/l-ilma għax-xorb (ppm) għad-doża kif inhi tabilħaqq, jekk applikabbli;

— Id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma.

2.2.4. **Ir-riżultati:**

— Il-piż tal-ġisem/it-tibdil fil-piż tal-ġisem;

— Il-konsum ta' l-ikel u ta' l-ilma jekk applikabbli;

— Id-data tar-rispons tossiku bis-sess u bil-livell tad-doża, inklużi s-sinjali tat-tossiċità;

— In-natura, il-qawwa u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (jekk humiex riversibbli jew le);

— L-eżaminazzjoni oftalmoloġika;

— it-testijiet ematoloġiċi bil-valuri *base-line* relevanti;

— it-testijiet tal-bijokemistrija klinika bil-valuri *base-line* relevanti;

— il-piż tal-ġisem terminali, il-piżijiet ta' l-organi u r-*ratios* tal-piż ta' l-organi u tal-ġisem;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet ħistopatoloġiċi kollha;

— Id-data ta' l-assorbiment jekk hi disponibbli;

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn hu xieraq;

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet.

▼B

B.28. **STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ DERMALI SUB-KRONIKA STUDJU DERMALI TAD-DOŻA RIPETUT GĦAL 90 ĠURNATA LI JUŻA SPEĊI TA' MAMMALI GERRIEMA**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test hija applikata ta' kuljum fuq il-ġilda f'dożi ggradati fuq għadd ta' gruppi t'annimali esperimentali, doża waħda għal kull grupp għal perjodu ta' 90 ġurnata. Matul dan il-perjodu t'applikazzjoni l-annimali huma osservati ta' kuljum sabiex jiġu skoperti sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu waqt it-test issirilhom nekroskopija, u fit-tmiem tat-test l-annimali li jissopravivu ssirilhom nekroskopija.

1.5. KRITERJI TAL-KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Preparazzjonijiet

L-annimali huma miżmumin taħt kundizzjonijiet ta' sistemazzjoni u għalf esperimentali għal mill-inqas ħamest ijiem qabel it-test. Qabel it-test annimali żgħar u b'saħħithom huma magħżulin u assenjati lil gruppi ttrattati u gruppi tal-kontroll. Ftit qabel it-testijiet il-fur huwa imqasqas miż-żona dorsali tat-tronk ta' l-annimali tat-test. Taqxir jista' jiġi użat iżda jista' biss jiġi magħmul bejn wieħed u ieħor 24 siegħa qabel it-test. Tqasqis jew taqxir ripetut huwa s-soltu meħtieġ bejn wieħed u ieħor f'intervalli ta' ġimgħa. Meta jitqasqas jew jitqaxxar il-fur wieħed irid joqgħod attent li jevita li jobrox il-ġilda. Mhux inqas minn 10 % tal-piż ta' l-erja tas-superfiċje tal-ġisem għandha tkun imnaddfa għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-piż ta' l-annimal irid jittieħed in kunsiderazzjoni meta jkun irid jiġi deċiż liema żona trid tkun imnaddfa u d-dimensjonijiet tal-kisi. Meta jiġu ttestjati s-solidi, li jistgħu jiġu magħmula fi trab jekk dan ikun xieraq, is-sustanza tat-test trid tkun imrattba bl-ilma jew, fejn meħtieġ, b'sustanza oħra xierqa biex tiżgura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Sustanzi likwidi tat-test huma ġeneralment użati mhux iddilwiti. Applikazzjoni ta' kuljum fuq bażi ta' ħamest ijiem fil-ġimgħa jew ta' sebat ijiem fil-ġimgħa hija użata.

Kundizzjonijiet tat-test

Annimali esperimentali

Il-far adult, il-fenek jew il-fenek ta' l-Indi jista' jkun użat. Speċi oħrajn jistgħu ikunu użati iżda l-użu tagħhom ikun jeħtieġ ġustifikazzjoni. Fil-bidu tat-test il-limitu tal-varjazzjoniji tal-piżijiet għandha tkun ± 20 % tal-piż intermedju. Fejn ikun amministrat test sub-kroniku dermali bħala minn studju preliminarju sa studju għal tul ta' żmien, l-istess speċi u razza għandha tintuża fiż-żewġ studji.

▼B

Numru u sess

Mill-inqas 20 annimal (10 ta' sess femminili u 10 ta' sess maskili) b'ġilda f'saħħitha għandhom ikunu użati f'kull livell tad-doża. L-annimali tas-sess femminili għandhom ikunu annimali li qatt ma welldu jew li m'humiex inċinta. Jekk hu ppjanat li xi annimali se jkunu ssagrifikati fl-intervall in-numru tagħhom għandu jkun miżjud skond in-numru t'annimali skedat biex jiġi ssagrifikat qabel it-terminu ta' l-istudju. B'addizzjoni ma' dan, grupp subordinat ta' 20 annimal (10 annimali għal kull sess) jistgħu jkunu ttrattati b'doża ta' livell qawwi għal 90 ġurnata u osservati għal riversibilità, persistenza jew okkorrenza ttardjata ta' effetti tossiċi għal 28 ġurnata wara t-trattament.

Livelli tad-doża

Mill-inqas tliet livelli tad-doża huma meħtieġa b'kontroll jew b'sustanza ta' kontroll jekk xi sustanza bħal din hija użata. Il-perjodu t'espożizzjoni għandu jkun mill-inqas ta' sitt siegħat kuljum. L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun magħmula f'ħinijiet simili kuljum, u l-ammont tas-sustanza applikata għandu jiġi aġġustat f'intervalli (ta' kull ġimgħa jew ta' kull ġimgħatejn) sabiex il-livell tad-doża, f'termini ta' piż tal-ġisem ta' l-annimali, jinżamm kostanti. Għajr għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jiġu ttrattati b'manjiera identika ta' dawk is-soġġetti tal-grupp tat-test. Fejn sustanza tkun użata sabiex jiġi ffaċilitat id-dożaġġ, il-grupp tal-kontroll għandu jkun mogħti doża bħal dik tal-gruppi ttrattati, u jirċievi l-istess ammont bħal dak li jkun riċevut mill-grupp ta' l-iktar livell qawwi ta' doża. L-iktar livell qawwi ta' doża għandu jirriżulta f'effetti tossiċi iżda ma jipproduċi l-ebda, jew ftit, fatalitajiet. L-inqas livell ta' doża m'għandux jipproduċi xi evidenza ta' tossiċità. Fejn hemm estimazzjoni użabbli ta' espożizzjoni umana l-inqas livell ta' doża jrid jaqbeż lil din l-estimazzjoni. Idealment, il-livell ta' doża intermedju għandu jipproduċi effetti tossiċi osservabbli minimi. Jekk iktar minn doża waħda intermedja hija użata, il-livelli tad-doża għandhom ikunu spazjati sabiex tiġi prodotta gradazzjoni ta' effetti tossiċi. Fil-gruppi baxxi u intermedji, u fil-gruppi tal-kontroll, l-inċidenza tal-fatalitajiet għandha tkun baxxa, biex tippermetti valutazzjoni sinjifikanti tar-riżultati.

Jekk l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test tipproduċi irritazzjoni severa tal-ġilda il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu mnaqqsin u dan jista' jirriżulta fi tnaqqis jew f'assenza ta' effetti tossiċi oħrajn fil-livell qawwi tad-doża. Jekk lill-ġilda saritilha ħsara jista' jkun neċessarju li l-istudju jiġi terminat u jsir studju ieħor b'konċentrazzjonijiet iktar baxxi.

Test ta' limitu

Jekk studju preliminarju b'livell ta' doża ta' 1 000 mg/kilogramma, jew doża ogħla, relatata ma' espożizzjoni umana possibbli, fejn hija magħrufa, ma jipproduċix l-ebda effetti tossiċi, testijiet iktar minn hekk jistgħu ma jkunux konsiderati neċessarji.

Perijodu t'osservazzjoni

L-annimali esperimentali għandhom ikunu osservati ta' kuljum għal sinjali ta' tossiċità. Il-ħin tal-mewt u l-ħin li fih jidhru s-sinjali tat-tossiċità għandhom ikunu miżmumin.

▼B

P r o ċ e d u r a

L-annimali għandhom jiġu magħluqin ġo gaġġa individwalment. L-annimali għandhom jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test, idealment fuq bażi ta' sebat ijiem fil-ġimgħa, għal perjodu ta' 90 ġurnata.

L-annimali fi gruppi subordinati skedati għal osservazzjonijiet ta' wara għandhom jiġu miżmuma għal 28 ġurnata iktar mingħajr trattament sabiex jiġi osservat l-irkupru mill-jew il-persistenza ta' l-effetti tossiċi. Il-ħin ta' l-espożizzjoni għandu jkun ta' sitt siegħat kuljum.

Is-sustanza tat-test għandha tkun applikata uniformement fuq żona li hija bejn wieħed u ieħor 10 % tas-superfiċje totali tal-ġisem. Fejn is-sustanzi huma tossiċi ħafna, l-erja tas-superfiċje miksija tista' tkun inqas iżda l-istess ammont ta' l-erja għandu jiġi miksi b'rita rqieqa u uniformi daqs kemm hu possibbli.

Matul l-espożizzjoni is-sustanza tat-test hija miżmuma f'kuntatt mal-ġilda permezz garża poruża u b'tejp li ma jirritax. Is-sît tat-test għandu jkun miksi iktar minn hekk b'mod xieraq biex iżomm il-garża u s-sustanza tat-test u jiżgura li l-annimali ma jkunux jistgħu jibilgħu is-sustanza tat-test. Rażżâna jistgħu jiġu użati sabiex jipprevejenu l-inġestjoni tas-sustanza tat-test iżda l-immobilizzazzjoni kompleta tas-sustanza tat-test m'huwiex metodu rakkomandat.

Fit-terminu tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, xi sustanza residwa tat-test għandha tiġi mneħħija fejn huwa prattiku permezz ta' l-ilma jew b'metodu ieħor xieraq li jnaddaf il-ġilda.

L-annimali kollha għandhom jiġu osservati ta' kuljum u sinjali ta' tossiċità għandhom ikunu miżmuma, inkluż il-ħin ta' l-ewwel attakk tagħhom, il-grad tagħhom u d-dewmien tagħhom. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-ġilda u fil-fur, fl-għajnejn u fil-membrani mukużi, kif ukoll fis-sistemi respiratorji, ċirkulatorji, awtonomiċi u nervużi ċentrali, fl-attività somatomotorja u fil-mudell ta' komportament. Qjisien tal-konsum ta' l-ikel għandhom jittieħdu ta' kull ġimgħa. Osservazzjonijiet regolari ta' l-annimali huma neċessarju sabiex l-annimali ma jiġux mitlufin mill-istudju minħabba kawżi bħal kannibaliżmu, awtolisi tat-tessuti jew minħabba li jiġu mqiegħdin f'post ieħor. Fit-terminu tal-perjodu ta' l-istudju s-sopravissuti fil-gruppi tat-trattament mhux subordinati issirilhom nekroskopija. Annimali moribondi għandhom jiġu mneħħija u għandha ssirilhom nekroskopija meta jkun avżat.

Dawn l-eżamijiet huma s-soltu magħmulin fuq l-annimali kollha inklużi dawk tal-kontroll:

(a) Eżami oftalmoloġiku, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir addattat ekwivalenti, għandu jiġi magħmul qabel l-espożizzjoni għas-sustanza tat-test u fit-terminu ta' l-istudju, preferibbilment fuq kull animal iżda mill-inqas fuq l-annimali tad-doża qawwija u fuq dawk tal-kontroll. Jekk tibdiliet fl-għajnejn huma skoperti l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati.

(b) Ematoloġija, inklużi l-ematokrit, il-konċentrazzjoni ta' l-emoglobina, il-kwantità ta' l-eritroċit, it-total u d-differenzali tal-kwantità ta' l-eritroċit, u l-qjies tal-potenzal tat-tagħqid tad-demm, bħall-ħin tat-tagħqid, il-ħin tal-protrombin, il-ħin tat-tromboplastin, jew il-kwantità tad-diski ż-żgħar fid-demm, għandhom ikunu nvestigati fit-terminu tal-perjodu tat-test.

▼B

(ċ) Determinazzjoni tal-bijokimika tal-klinika fuq id-demm għandha tkun magħmula fit-terminu tal-perjodu tat-test. Iż-żoni tat-test li huma konsiderati xierqa għall-istudji kollha huma l-bilanċ elettrolit, il-metaboliżmu tal-karboidrati, il-funzjoni tal-fwied u tal-kliewi. Is-selezzjoni ta' testijiet speċifiċi jiġu nfluwenzati b'osservazzhonijiet fuq il-mod t'azzjoni tas-sustanza. Determinazzjonijiet suġġeriti huma l-kalċju, l-fosfru, l-kloru, s-sodju, l-potassju, il-glukosju tas-sawm (b'perjodu ta' sawm addattat għall-ispeċi), transaminat tas-serkum glutamiku pirviku [6], transaminat tas-serum glutamiku ożaloċetiku [7], dekarbonat ta' l-ornitin, transpeptidu tal-gamma glutamiku, nitroġenu ta' l-urea, albumina, kreatina tad-demm, u t-total tal-qjies tal-proteini tal-bilirubin u tas-serum. Determinazzjonijiet oħrajn li jistgħu jkunu neċessarji għal valutazzjoni xierqa tossikoloġika jinkludu analiżi tal-lipidi, ormoni, bilanċ ta' l-aċidu/alkali, attività metemoglobina u kolìnestera. Bijokimika tal-klinika addizzjonali tista' tkun użata fejn ikun neċessarju sabiex tiġi estiża l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati.

(d) Analiżi kimika ta' l-awrina m'hijiex meħtieġa fuq bażi ta' rutina iżda hija biss meħtieġa meta hemm indikazzjoni bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata.

Jekk id-data storika tal-linja bażi m'hijiex adegwata, għandha tingħata kunsiderazzjoni lid-determinazzjoni tal-parametri tal-bijokimika ematoloġika u klinika qabel ma jibda d-dożaġġ.

Nekroskopija totali

L-annimali kollha għandhom ikunu soġġetti għal nekroskopija totali u sħiħa li tinkludi eżami tas-superfiċje esterna tal-ġisem, ta' kull fetħa tal-ġisem, u tal-ħofor kranjali, toraċiċi u addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-tirojde (bil-paratirojde), u t-testikoli għandhom ikunu peżati friski malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex jiġi evitat li jixxottaw. L-organi u t-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati għal xi eżamijiet istopatoloġiċi futuri possibbli: il-ħsarat kbar fil-ġisem, il-moħħ – inklużi sezzjonijiet tal-medulla/parti ta' l-għerq tal-moħħ li tgħaqqad il-medulla oblongata mat-talamu, il-kortiċi taċ-ċervellett u l-kortiċi celebrali, it-tessut pitwitarju, it-tessut tat-tirojde jew tal-paratirojde, it-tessut tat-timu, (it-trakea), il-pulmuni, il-qalb, l-aorta, il-glandoli tar-rieq, il-fwied, il-milsa, il-kliewi, l-adrenali, il-frixa, il-gonadi, l-utru (l-organi ġenitali aċċessorji), (il-ġilda), il-bużżieqa tal-marrara, l-esofagu, l-istonku, id-duwodenu, il-parti ta' bejn id-duwodenu u l-ilju, l-ilju, il-musrana l-għamja, il-musrana l-ħoxna, ir-rektum, il-bużżieqa ta' l-awrina, il-glandola limfatika rappreżentattiva, (il-glandola tal-ħalib tas-sess femminil), (il-muskolatura tal-koxxa), in-nerv periferali, (l-għajnejn), l-isternu bl-għadam tal-mudullun, (il-wirk, inkluża s-superfiċje artikulari), u (n-nerv li jgħaddi minn ġos-sinsla fuq tliet livelli – ċervikali, toraċiku tan-nofs u tal-ġenbejn). It-tessuti msemmijin fil-parentesi għandhom jiġu eżaminati biss jekk jiġu indikati permezz ta' sinjali ta' tossiċità, jew permezz ta' involviment ta' l-organu li huwa t-targit.

Eżami istopatoloġiku

(a) Istopatoloġija sħiħa għandha tiġi magħmula fuq ġilda normali u ttrattata u fuq l-organi u t-tessuti ta' l-annimali fil-gruppi tal-kontroll u tad-doża qawwija.

(b) Kull ħsara serja għandha tiġi eżaminata.

▼B

(ċ) Organi tat-targit fi gruppi ta' doża oħrajn għandhom jiġu eżaminati.

(d) Fejn il-firien huma użati, il-pulmuni ta' l-annimali fil-gruppi ta' doża baxxa u imtermedja għandhom jiġu soġġetti għal eżami istopatoloġiku għal evidenza ta' infezzjoni, billi dan jipprovdi valutazzjoni konvenjenti ta' l-istat ta' saħħa ta' l-annimali. Eżami istopatoloġiku iktar fil-fond jista' ma jkunx meħtieġ bħala rutina fuq l-annimali f'dawn il-gruppi, iżda għandu dejjem isir fl-organi li juru evidenza ta' ħsara fil-gruppi ta' doża qawwija.

(e) Meta grupp subordinat huwa użat, l-istopatoloġija għandha tkun magħmula fuq it-tessuti u fuq l-organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi l-oħrajn ittrattati.

2. **DATA**

Id-data għandha tiġi miġbura fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali li kien hemm fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li juru ħsara f'ġisimhom, it-tip ta' ħsara f'ġisimhom u l-persentaġġ ta' l-annimali li juru iż-żewġ tipi ta' ħsara. Ir-riżultati għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' l-istatistika xieraq. Kwalunkwe metodu ta' l-istatistika rikonoxxut jista' jintuża.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jkun fih l-informazzjoni li ġejja, jekk possibbli:

— in-nisel ta' l-ispeċi jew ir-razza, minn fejn ġejja l-ispeċi, il-kundizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta;

— il-kundizzjonijiet tat-test;

— il-livelli tad-doża (inkluża xi sustanza, jekk użata) u konċentrazzjonijiet;

— data tar-rispons tossiku, bis-sess u d-doża;

— il-livell fejn m'hemmx effett, meta possibbli;

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali ssopravivewx sat-tmiem;

— deskrizzjoni ta' effetti tossiċi jew effetti oħrajn (b'attenzjoni partikolari għal skoperti tal-klinika);

— il-ħin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u ż-żmien sussegwenti;

— data ta' l-għalf u tal-piż tal-ġisem;

— skoperti oftalmoloġiċi;

— testijiet ematoloġiċi użati u r-riżultati kollha;

— testijiet tal-bijokimika tal-klinika użati u r-riżultati kollha (inklużi r-riżultati ta' xi analiżi kimika ta' l-awrina);

— skoperti tan-nekroskopija;

▼B

— dekrizzjoni dettaljata ta' l-iskoperti istopatoloġiċi kollha;

— trattament ta' l-istatistika tar-riżultati fejn huwa xieraq;

— diskussjoni tar-riżultati;

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

▼M4

B.29. **TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI SUBKRONIKA: STUDJU TA' 90 JUM**

SOMMARJU

Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.29 rivedut tfassal biex jikkaratterizza b'mod sħiħ it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni għal durata subkronika (90 jum), u biex jipprovdi dejta robusta għall-valutazzjonijiet tar-riskju ta' inalazzjoni kwantitattiva. Gruppi ta' 10 rodituri rġiel u 10 nisa jkunu esposti 6 sigħat kuljum matul perjodu ta' 90 jum (13-il ġimgħa) għal a) il-kimika għall-ittestjar fi tliet livelli jew aktar ta' konċentrazzjoni, b) l-arja ffiltrata (kontroll negattiv), u/jew c) il-vejjikolu (kontroll ta' vejjikolu). L-annimali jkunu esposti ġeneralment għal 5 ijiem fil-ġimgħa iżda l-espożizzjoni għal 7 ijiem fil-ġimgħa hija wkoll permessa. L-iġiel u nisa jkunu dejjem ittestjati, iżda jkunu jistgħu jiġu esposti f'livelli differenti ta' konċentrazzjoni jekk ikun magħruf li sess wieħed ikun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar. Dan il-metodu jippermetti lid-direttur tal-istudju jkun flessibbli biex jinkludi gruppi satellitarji (riversibbli), qatliet interim, ħasil tal-bronkoalveolari (BAL), testijiet newroloġiċi u patoloġija klinika addizzjonali u evalwazzjonijiet istopatoliġiċi biex it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar tkun ikkaratterizzata aħjar.

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test 413 (2009) tal-OECD. Il-Linja Gwida tat-Test 413 (TG 413) oriġinali dwar inalazzjoni subkronika kienet adottata fl-1981 (1). Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.29 (bħala ekwivalenti għat-TG 413 (2009) riveduta) kien aġġornat biex jirrifletti l-istat tax-xjenza u biex jissodisfa ħtiġijiet regolatorji preżenti u futuri.

2. Studji dwar tossiċità ta' inalazzjoni subkronika jintużaw primarjament biex ikunu dderivati konċentrazzjonijiet regolatorji għall-valutazzjoni tar-riskju ta' ħadddiema f'konfigurazzjonijiet okkupazjonali. Jintużaw ukoll biex ikun ivvalutat riskju residenzjali, ta' trasport u ambjentali għall-bniedem. Dan il-metodu jgħin biex ikunu kkaratterizzati effetti ħżiena wara espożizzjoni ripetuta kuljum ta' inalazzjoni għal kimika għall-ittestjar għal 90 jum (madwar 10 % tal-ħajja kollha ta' far). Id-dejta derivata minn studji dwar tossiċità ta' inalazzjoni subkronika tista' tintuża għal valutazzjonijiet tar-riskji kwantitattivi u għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet għal studji kroniċi. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux maħsub speċifikatament għall-ittestjar tan-nanomaterjali. Id-definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma pprovduti fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida (GD) 39 (2).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

3. L-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju biex tissaħħaħ il-kwalità tal-istudju u biex l-użu tal-annimali jkun minimizzat. L-informazzjoni li għandha tassisti fl-għażla ta' konċentrazzjonijiet ta' testijiet adatti tista' tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli u dejta tossikoloġika dwar kimiċi relatati strutturalment; u dejta derivata minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjoni. Jekk tkun mistennija jew osservata newrotossiċità waqt li jkun għaddej l-istudju, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jinkludi evalwazzjonijiet xierqa bħal gaġġa funzjonali ta' osservazzjoni (FOB) u kejl ta' attività motorja. Għalkemm l-għażla sewwa tal-ħin ta' espożizzjonijiet relattivi għal eżamijiet speċifiċi tista' tkun kritika, il-prestazzjoni ta' dawn l-attivitajiet addizzjonali m'għandhiex tfixkel id-disinn bażiku tal-istudju.

▼M4

4. Dilwizzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar korrużivi jew irritanti jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet li għandhom irendu l-grad mixtieq ta' tossiċità. Jekk jogħġbok irreferi għal GD 39 (2) għal aktar informazzjoni. Meta l-annimali jkunu esposti għal dawn il-materjali, il-konċentrazzjonijiet immirati għandhom ikunu baxxi biżżejjed li ma joħolqux uġigħ kbir u diffikultà, iżda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta' konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilħqu l-għan regolatorju u xjentifiku tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jintgħażlu abbażi ta' każ każ, preferibbilment imsejsa fuq studju mfassal b'mod adegwat ta' detezzjoni ta' firxa li jipprovdi informazzjoni dwar il-punt ta' tmiem kritiku, dwar kull limitu ta' irritazzjoni u dwar il-ħin ta' meta beda (ara l-paragrafi 11-13). Għandha tingħata l-ġustifikazzjoni għal għażla tal-konċentrazzjoni.

5. L-annimali moribondi jew annimali li jkunu jidhru li jkunu muġugħa jew li juru sinjali ta' diffikultà severa u fit-tul għandhom jinqatlu b'mod uman. L-annimali moribondi jitqiesu bl-istess mod bħal annimali li jmutu waqt it-test. Il-kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni li jinqatlu annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu ħafna, u l-gwida biex ikun magħruf meta l-mewt tkun tista' titbassar jew tkun waslet qrib ħafna, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' Speċi tal-Annimali

6. Għandhom jintużaw rodituri adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi preferuta hija l-far. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw speċijiet oħra.

Preparazzjoni tal-Annimali

7. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal. Fil-jum li fih jintgħażlu b'mod każwali, l-annimali għandhom ikunu adulti żgħażagħ li jkunu minn 7 sa 9 ġimgħat fl-età. Il-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' ±20 % tal-piż medju għal kull sess. L-annimali jintgħażlu b'mod każwali, jiġu mmarkati għal identifikazzjoni individwali, u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 ijiem qabel ma jibda t-test biex jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Trobbija tal-Annimali

8. L-annimali għandhom ikunu identifikati individwalment, preferibbilment bi transponders taħt il-ġilda, biex ikunu ffaċilitati l-osservazzjonijiet u tkun evitata l-konfużjoni. It-temperatura tal-kamra ta' manutenzjoni tal-annimali esperimentali għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara l-espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-għadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull annimal u għandu jimminimizza t-telf minħabba kannibaliżmu u ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieħer biss, jista' jkun jeħtiġilhom jidraw it-tubi ta' trażżin. It-tubi ta' trażżin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusklu. Jekk tkun disponibbli dejta ġenerika li turi li ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa ċertu limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx meħtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trażżin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jitħallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' sħabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, ħlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

▼M4

Kmamar tal-Inalazzjoni

9. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-oġġett tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-modalità ppreferuta ta' espożizzjoni hija mill-imnieħer biss (liema fraži tinkludi r-ras biss, l-imnieħer biss, jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieħer biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu aħjar billi tintuża modalità ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu, iżda dan għandu jkun iġġustifikat fir-rapport tal-istudju. Biex tkun żgurata stabbiltà tal-atmosfera meta tintuża kamra għall-ġisem kollu, il-volum totali tal-annimali tat-test m'għandux ikun aktar minn 5 % tal-volum tal-kamra. Il-prinċipji tat-tekniki tal-espożizzjoni mill-imnieħer biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma indirizzati f'GD 39 (2).

STUDJI DWAR IT-TOSSIĊITÀ

Konċentrazzjonijiet Limitati

10. B'differenza minn studji akuti, m'hemmx konċentrazzjonijiet ta' limitu ddefiniti fi studji dwar it-tossiċità ta' inalazzjoni subkronika. Il-konċentrazzjoni massima ttestjata għandha tqis: 1) il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb, 2) il-livell ta' "l-agħar każ" ta' espożizzjoni umana, 3) il-ħtieġa li tinżamm provvista adegwata ta' ossiġenu, u/jew 4) konsiderazzjonijiet ta' trattament xieraq tal-annimali. Fin-nuqqas ta' limiti abbażi ta' dejta, jistgħu jintużaw il-limiti akuti tar-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (13) (jiġifieri, sa konċentrazzjoni massima ta' 5 mg/l għal aerosols, 20 mg/l għal fwar u 20 000 ppm għal gassijiet); irreferi għal GD 39 (2). Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk ikun meħtieġ li dawk il-limiti jinqabżu meta jkunu ttestjati gassijiet jew kimiċi għall-ittestjar volatili ħafna (eż. refriġeranti). Il-konċentrazzjoni limitata għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolqot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

Studju dwar id-Detezzjoni ta' Firxa

11. Qabel ma jingħata bidu għall-istudju ewlieni, ġeneralment ikun meħtieġ li jsir studju dwar id-detezzjoni ta' firxa. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa huwa aktar komprensiv minn studju ta' osservazzjoni minħabba li mhux limitat għal għażla ta' konċentrazzjonijiet. It-tagħlim li hemm x'wieħed jieħu minn studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jwassal biex studju ewlieni jirnexxi. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista', pereżempju, jipprovdi informazzjoni teknika dwar metodi analitiċi, teħid tad-daqs tal-partiċelli, sejbien ta' mekkaniżmi tossiċi, patoloġija klinika u dejta istopatoloġika u stimi ta' x'jistgħu ikunu konċentrazzjonijiet NOAEL u MTC fi studju ewlieni. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża l-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa biex jidentifika l-limitu ta' irritazzjoni tas-sistema respiratorja (eż. b'istopatoloġija tas-sistema respiratorja, l-ittestjar tal-funzjoni pulmonarja jew il-ħasil tal-bronkoalveolari), il-konċentrazzjoni ogħla li hija tollerata mingħajr tensjoni bla bżonn għall-annimali u l-parametri li għandhom jikkaratterizzaw bl-aħjar mod it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar.

12. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jikkonsisti f'livell wieħed jew aktar ta' konċentrazzjonijiet. Skont il-punti ta' tmiem magħżulin, għandhom ikunu esposti minn tlieta sa sitt irġiel u minn tlieta sa sitt nisa f'kull livell ta' konċentrazzjoni. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa għandu jdum mill-anqas 5 ijiem u ġeneralment mhux aktar minn 28 jum. Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet għall-istudju ewlieni għandu jingħata fir-rapport ta' studju. L-għan tal-istudju ewlieni huwa li tintwera relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons ibbażata fuq dak li huwa mistenni li jkun l-aktar punt ta' tmiem sensittiv. Il-konċentrazzjoni baxxa għandha idealment tkun konċentrazzjoni ta' ebda effett ħażin osservat, filwaqt li l-konċentrazzjoni għolja għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolqot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

▼M4

13. Meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni għall-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa, l-informazzjoni kollha disponibbli għandha titqies li tinkludi relazzjonijiet ta' attività strutturata u dejta għal kimiċi simili (ara l-paragrafu 3). Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jivverifika/jirrifjuta dawk li jitqiesu li jkunu l-punti ta' tmiem l-aktar sensittivi bbażati b'mod mekkaniku, eż. inibizzjoni ta' kolinesteraži b'organofosfati, formazzjoni ta' metemoglobina b'aġenti eritroċitotossiċi, ormoni tat-tirojde (T3, T4) għal tirotossikanti, proteina, LDH jew newtrofili f'ħasil tal-bronkoalveolari għal partiċelli li ftit jinħallu li ma jagħmlux ħsara jew aerosols li jirritaw il-pulmun.

Studju ewlieni

14. L-istudju subkroniku ewlieni dwar tossiċità ġeneralment jikkonsisti fi tliet livelli ta' konċentrazzjoni, u wkoll kontrolli konkurrenti negattivi (arja) u/jew ta' vejjikoli skont il-ħtieġa (ara l-paragrafu 18). Id-dejta kollha disponibbli għandha tkun utilizzata bħala għajnuna fl-għażla ta' livelli adatti ta' espożizzjoni, inklużi r-riżultati ta' studji sistemiċi ta' tossiċità, metaboliżmu u kinetika (għandha ssir enfaži partikolari biex ikunu evitati livelli għoljin ta' konċentrazzjoni li jissaturaw proċessi kinetiċi). Kull grupp ta' test ikollu fih 10 rodituri rġiel u 10 nisa li jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar għal 6 siegħat kuljum fuq bażi ta' 5 ijiem fil-ġimgħa għal perjodu ta' 13-il ġimgħa (l-eżami jdum b'kollox mill-anqas 90 jum). L-annimali jistgħu wkoll ikunu esposti 7 ijiem fil-ġimgħa (eż. meta l-ittestjar ikun ħa l-farmaċewtiċi man-nifs). Jekk ikun magħruf li wieħed miż-żewġ sessi jkun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar, is-sessi jkunu jistgħu jiġu esposti f'livelli differenti ta' konċentrazzjoni biex isir l-aħjar użu mill-konċentrazzjoni-rispons kif deskritt fil-paragrafu 15. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta l-espożizzjoni ddum anqas minn 6 siegħat/jum, jew meta jkun meħtieġ li jsir studju ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu li jdum aktar (eż. 22 siegħa/jum) (irreferi għal GD 39) (2). M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzzjoni sakemm espożizzjoni ma ddumx aktar minn 6 siegħat. Jista' jingħata l-ilma matul l-espożizzjoni kollha mill-ġisem kollu.

15. Il-konċentrazzjonijiet immirati magħżulin għandhom jidentifikaw l-organu/i mmirat(i) u juru konċentrazzjoni-rispons ċari:

— Il-livell għoli ta' konċentrazzjoni għandu jirriżulta f'effetti tossiċi iżda m'għandux jikkawża sinjali jew letalità li jdumu u li ma jħallux li ssir evalwazzjoni li tagħmel sens.

— Il-livell(i) intermedju/i ta' konċentrazzjoni għandhom ikunu spazjati biex jipproduċu gradazzjoni ta' effetti tossiċi bejn dawk tal-konċentrazzjoni baxxa u dawk tal-konċentrazzjoni għolja.

— Il-livell baxx ta' konċentrazzjoni għandu jipproduċi ftit jew ebda evidenza ta' tossiċità.

Qatliet Interim

16. Jekk ikunu ppjanati qatliet interim, l-għadd ta' annimali f'kull livell ta' konċentrazzjoni għandu jiżdied bl-għadd li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Għandu jingħata l-motiv għal użu ta' qatliet interim, u analiżi ta' statistika għandha tagħti spjegazzjoni sewwa tagħhom.

▼M4

Studju Satellitarju (Riversibbiltà)

17. Studju satellitarju (riversibbiltà) jista' jintuża biex ikunu osservati r-riversibbiltà, il-persistenza jew l-okkorrenza mdewma ta' tossiċità għal perjodu ta' wara trattament ta' tul xieraq, iżda ta' mhux anqas minn 14-il jum. Gruppi satellitarji (riversibbli) jikkonsistu f'10 rġiel u 10 nisa esposti kontemporanjament mal-annimali tal-esperiment fl-istudju ewlieni. Gruppi ta' studju satellitarju (riversibbli) għandhom ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar fl-ogħla livell ta' konċentrazzjoni u għandu jkun hemm arja konkurrenti u/jew kontrolli ta' vejjikoli skont il-ħtieġa (ara l-paragrafu 18).

Annimali tal-Kontroll

18. L-annimali tal-kontroll negattiv (arja) konkurrenti għandhom ikunu mmaniġġati b'mod identiku għall-grupp ta' annimali tat-test ħlief li huma jkunu esposti għal arja filtrata milli għal kimika għall-ittestjar. Meta l-ilma jew sustanza oħra jintużaw biex jassistu biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test, fl-istudju għandu jkun inkluż grupp ta' kontroll ta' vejjikoli, minflok grupp ta' kontroll negattiv (arja). Kull meta jkun possibbli għandu jintuża l-ilma bħala l-vejjikolu. Meta l-ilma jintuża bħala l-vejjikolu, l-annimali ta' kontroll għandhom ikunu esposti għal arja bl-istess umdità relattiva bħal tal-gruppi esposti. L-għażla ta' vejjikolu adattat għandha tkun ibbażata fuq studju minn qabel immexxi sewwa jew fuq dejta storika. Jekk it-tossiċità ta' vejjikolu ma' tkunx magħrufa sewwa, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża kemm kontroll negattiv (arja), kif ukoll kontroll ta' vejjikolu, iżda dan għandu jkun skuraġġit ħafna Jekk dejta storika turi li vejjikolu ma jkunx tossiku, f'dak il-każ ma jkunx hemm ħtieġa għal grupp ta' kontroll negattiv (arja) u għandu jintuża biss kontroll tal-vejjikolu. Jekk studju minn qabel ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma turi ebda tossiċità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata u għandu jintuża dan il-kontroll ta' vejjikolu.

KONDIZZJONIJIET TAL-ESPOŻIZZJONI

Amministrazzjoni tal-Konċentrazzjonijiet

19. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew taħlita tagħhom. L-istat fiżiku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mill-konċentrazzjonijiet magħżulin, u/jew mill-forma fiżika li x'aktarx ħafna jkun hemm matul it-trattament u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet esplussivi. Il-materjal tal-partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli. Gwida ulterjuri hija pprovduta f'GD 39 (2).

Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Partiċelli

20. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex titħalla jkun hemm espożizzjoni tar-reġjuni kollha rilevanti tas-sistema respiratorja, huma rrakkomandati aerosols b'dijametri ajrudinamiċi ta' medjan tal-massa (MMAD) f'firxa minn 1 sa 3 μm b'devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g) fil-firxa ta' 1,5 sa 3,0 (4). Għalkemm għandu jsir sforz raġonevoli biex dan l-istandard jintlaħaq, għandu jkun ipprovdut ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, partiċelli ta' dħaħen tal-metall ikunu iżgħar minn dan l-istandard, u partiċelli u fibri ċċarġjati tad-dħaħen tal-metall jistgħu jaqbżuh.

▼M4

Preparazzjoni tal-Kimika għall-Ittestjar f'Vejjikolu

21. Idealment, il-kimika għall-ittestjar għandha tiġi ttestjata mingħajr vejjikolu. Jekk ikun meħtieġ jintuża vejjikolu biex ikunu ġġenerati l-konċentrazzjoni adattata tal-kimika għall-ittestjar u d-daqs tal-partiċelli, l-ilma għandu jingħata preferenza. Kull darba li kimika għall-ittestjar tinħall f'vejjikolu, l-istabbiltà tagħha għandha tintwera.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Fluss tal-Arja fil-Kamra

22. Il-fluss tal-arja mal-kamra ta' espożizzjoni għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u rreġistrat mill-anqas kull siegħa matul kull espożizzjoni. Il-monitoraġġ f'ħin reali tat-konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà temporali) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdi mezzi indiretti għall-kontroll tal-parametri rilevanti u dinamiċi kollha tal-inalazzjoni. Jekk il-konċentrazzjoni tkun immonitorjata f'ħin reali, il-frekwenza tal-kejl ta' flussi ta' arja tista' titnaqqas sa kejl wieħed għal kull espożizzjoni għal kull jum. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex ikun evitat teħid mill-ġdid ta' nifs fil-kmamar għall-imnieħer biss. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u l-konċentrazzjoni ta' dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wieħed jemmen li dan l-istandard ma jkunx jista' jitlaħaq, il-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu u tad-dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu. Jekk il-kejlijiet fl-ewwel jum ta' espożizzjoni juru li dawn il-gassijiet ikunu ta' livelli tajbin, ma jkunux meħtieġa aktar kejlijiet.

Temperatura tal-Kamra u Umdità Relattiva

23. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm għal 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieħer biss, kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata kontinwament u rreġistrata kull siegħa matul kull espożizzjoni meta jkun possibbli. L-umdità relattiva għandha preferibbilment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati taħlitiet abbażi ta' ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minħabba interferenza minn kimika għall-ittestjar mal-Metodu ta' Ttestjar.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni Nominali

24. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominal tal-kamra tal-espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda hija paragun tal-konċentrazzjoni nominali u l-konċentrazzjoni attwali tagħti indikazzjoni tal-effiċjenza ta' ġenerazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, tista' tintuża biex jinkixfu problemi ta' ġenerazzjoni.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni attwali

25. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar kif ikun itteħdilha l-kampjun tagħha fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu jew b'metodi speċifiċi (eż. teħid dirett ta' kampjuni, metodi ta' assorbiment jew kimiċi reattivi u karatterizzazzjoni analitika sussegwenti) jew b'metodi mhux speċifiċi bħal analiżi gravimetrika b'filtru. L-użu ta' analiżi gravimetrika huwa aċċettabbli biss għal aerosols tat-trab b'komponent wieħed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilità baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għall-kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'ħafna komponenti tista'

▼M4

wkoll tkun iddeterminata b'analiżi gravimetrika. Iżda din teħtieġ dejta analitika li turi li l-kompożizzjoni ta' materjal tal-ajru tkun simili għall-materjal tal-bidu. Jekk din l-informazzjoni ma tkunx disponibbli, tista' tkun meħtieġa analiżi mill-ġdid tal-kimika għall-ittestjar (idealment fl-istat tagħha fl-arja) f'intervalli regolari waqt li jkun għaddej l-istudju. Għal aġenti aerosolizzati li jistgħu jevaporaw jew jissubblimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu nġabru bil-metodu magħżul.

26. Għandu jintuża lott wieħed tal-kimika għall-ittestjar sakemm idum l-istudju, jekk ikun possibbli, u l-kampjun tat-test għandu jinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-purezza, l-omoġeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbeda l-istudju, għandu jkun hemm karatterizzazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkluża l-purezza tagħha, u jekk teknikament fattibbli, l-identità u l-kwantitajiet ta' kontaminanti u impuritajiet identifikati. Dan jista' jintwera bid-dejta li ġejja, iżda ma jkunx limitat għaliha: ħin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimi oħra. Għalkemm l-identità tal-kampjun tat-test mhix ir-responsabbiltà tal-laboratorju tat-test, ikun prudenti għal-laboratorju tat-test li jikkonferma l-karatterizzazzjoni tal-isponser mill-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

27. L-atmosfera ta' espożizzjoni għandha tinżamm kostanti daqs kemm ikun prattikabbli. Jista' jintuża apparat ta' monitoraġġ f'ħin reali, bħal fotomiter tal-aerosol għal aerosols jew analizzatur ta' idrokarbur totali għal fwar biex tintwera l-istabbiltà tal-kundizzjonijiet ta' espożizzjoni. Konċentrazzjoni attwali tal-kamra għandha titkejjel mill-anqas 3 darbiet matul kull jum ta' espożizzjoni għal kull livell ta' konċentrazzjoni. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minħabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew minħabba konċentrazzjonijiet baxxi, kampjun wieħed għal kull perjodu ta' espożizzzjoni jkun aċċettabbli. Idealment, dan il-kampjun għandu mbagħad jinġabar tul il-perjodu kollu ta' espożizzzjoni. Il-kampjuni individwali tal-konċentrazzjoni tal-kamra jistgħu jkollhom devjazzjoni mill-konċentrazzjoni medja tal-kamra b'mhux aktar minn ± 10 % għall-gassijiet u l-fwar, u b'mhux aktar minn ± 20 % għall-aerosols likwidi jew solidi. Il-ħin biex tinkiseb ekwilibrazzjoni tal-kamra (t_{95}) għandu jkun ikkalkulat u rrappurtat. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-ħin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata. Din tqis il-ħinijiet meħtieġa biex jinkisbu l-ekwilibrazzjoni (t_{95}) u d-degradazzjoni tal-kamra. Gwida għal stima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (2).

28. Għal taħlitiet kumplessi ħafna li jikkonsistu f'gassijiet/fwar u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodotti/mezzi ta' użu finali b'għan speċifiku), kull fażi tista' taġixxi b'mod differenti f'kamra tal-inalazzjoni. Għalhekk għandha tintgħażel mill-anqas sustanza indikatriċi waħda (analita), normalment l-ingredjent prinċipali attiv fit-taħlita, ta' kull fażi (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun taħlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-taħlita totali, u mhux biss għall-ingredjent attiv jew għas-sustanza indikatriċi (analita). Informazzjoni addizzjonali dwar il-konċentrazzjonijiet attwali tinsab f'GD 39 (2).

Kimika għall-Ittestjar: Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Partiċelli

29. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas kull ġimgħa għal kull livell ta' konċentrazzjoni billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv bħall-għodda ajrudinamika li tagħti d-daqs tal-partiċelli (APS). Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza tar-riżultati miksubin minn impattur kaskata u mill-istrument alternattiv, f'dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista' jintuża tul l-istudju kollu.

▼**M4**

30. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża flimkien mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-ġabra. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi tad-daqs ta' partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi b'filtru [ara GD 39 (2)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-konċentrazzjonijiet kollha ttestjati fil-fażi bikrija tal-istudju, f'dak il-każ il-kejlijiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jitħallew barra. Biex jinżamm trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista' twassal għal ħtieġa ta' ripetizzjoni ta' studju.

31. It-teħid tad-daqs ta' partiċelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista' tirriżulta kondensazzjoni ta' fwar fil-formazzjoni ta' aerosol, jew jekk jinstabu partiċelli f'atmosfera ta' fwar b'potenzjal għal fażijiet imħallta.

OSSERVAZZJONIJIET

32. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament qabel, matul, u wara l-perjodu ta' espożizzjoni. Jistgħu jkunu indikati osservazzjonijet aktar ta' spiss skont ir-rispons tal-annimali matul espożizzjoni. Meta l-osservazzjoni tal-annimali tkun imfixkla bl-użu ta' tubi ta' trażżin tal-annimali, bi kmamar għall-ġisem kollu mixgħulin ħażin, jew b'atmosferi opaki, l-annimali għandhom ikunu osservati bir-reqqa wara l-espożizzjoni. L-osservazzjonijiet qabel l-espożizzjoni tal-jum li jkun imiss tista' tivvaluta kull riversibbiltà jew effetti tossiċi li jkunu marru aktar għall-agħar.

33. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'reġistri individwali miżmumin għal kull annimal. Meta annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.

34. Osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludi bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn, il-membrani mukużi; bidliet fis-sistema respiratorja u ċirkulatorja; bidliet fis-sistema nervuża; u bidliet f'attività somatomotorja u xejriet ta' mġiba. L-attenzjoni għandha tkun diretta għal osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulżjonijiet, tbeżliq, dijarea, letarġija, rqad u koma. Il-kejl tat-temparaturi tar-rektum jista' jipprovdi evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ipo/ipertermja relatati mat-trattament jew l-għeluq. Valutazzjonijiet addizzjonali jistgħu jkunu inklużi fil-protokoll ta' studju bħal kinetika, monitoraġġ bijoloġiku, funzjoni tal-pulmun, ritenzjoni ta' materjali li ftit jinħallu li jingħemgħu fit-tessut tal-pulmun u bidliet ta' mġiba.

PIŻIJIET TAL-ĠISEM

35. Il-piżijiet tal-annimali indivdwali għandhom jiġu rreġistrati ftit qabel l-ewwel espożizzjoni (jum 0), u darbtejn fil-ġimgħa wara din (pereżempju: nhar ta' Ġimgħa u nhar ta' Tnejn biex juru l-irkupru matul tmiem il-ġimgħa mingħajr espożizzjoni jew matul intervall tal-ħin biex jippermetti valuazzjoni tat-tossiċità sistematika) jew fil-mument tal-mewt jew l-ewtanażja. Jekk ma jkunx hemm effetti fl-ewwel 4 ġimgħat, il-piżijiet tal-ġisem jistgħu jitkejlu kull ġimgħa għall-bqija tal-istudju. L-annimali satellitarji (riversibbli) (jekk użati) għandhom jibqgħu jintiżnu kull ġimgħa tul il-perjodu kollu ta' rkupru. Fi tmiem l-istudju, l-annimali kollha għandhom jintiżnu ftit qabel il-qatla biex titħalla ssir kalkulazzjoni imparzjali ta' proporzjonijiet ta' organi ma' piżijiet tal-ġisem.

KONSUM TA' IKEL U ILMA

36. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel kull ġimgħa. Il-konsum tal-ilma wkoll jista' jitkejjel.

▼M4

PATOLOĠIJA KLINIKA

37. Valutazzjonijiet ta' patoloġija klinika għandhom isiru għall-annimali kollha, inklużi annimali ta' kontrolli u satellitarji (riversibbli), meta jinqatlu. L-intervall ta' ħin bejn tmiem espożizzjoni u ġbir ta' demm għandu jiġi rreġistrat, l-aktar meta l-kostituzzjoni mill-ġdid tal-punt ta' tmiem indirizzat tkun mgħaġġla. It-teħid ta' kampjuni wara tmiem espożizzjoni huwa indikat għal dawk il-parametri b'nofs ħajja plażmatika qasira (eż. COHb, CHE, u MetHb).

38. It-Tabella 1 telenka l-parametri ta' patoloġija klinika li ġeneralment ikunu meħtieġa għall-istudji tossikoloġiċi kollha. L-analiżi tal-awrina ma tkunx meħtieġa abbażi ta' rutina, iżda tista' ssir meta titqies utli bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jivvaluta parametri addizzjonali biex jikkaratterizza aħjar it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar (eż. kolinesteraži, lipidi, ormoni, bilanċ ta' aċidu/bażi, metemoglobina jew korpi ta' Heinz, kinaži tal-kreatina, proporzjon ta' mjelojde/eritrojde, troponini, gassijiet ta' demm arterjali, deidroġenaži lattat, sorbital deidroġenaži, glutamat ta' deidroġenaži u gamma glutamil transpeptidaži).

Tabella 1

Parametri Standard ta' Patoloġija Klinika

Ematoloġija	
Għadd ta' eritroċiti	Għadd totali ta' lewkoċiti
Ematokrit	Għadd differenzjali ta' lewkoċiti
Konċentrazzjoni ta' emoglobina	Għadd ta' pjastrini
Emoglobina korpuskulari medja	Potenzjal għal emboliżmu (agħżel wieħed):
Volum korpuskulari medju	— Ħin protrombin
Konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja	— Ħin ta' emboliżmu
Retikuloċiti	— Ħin tromboplastin parzjali

Kimika klinika	
Glukożju (*)	Aminotransferaži tal-alanina
Kolesterol totali	Aspartate aminotransferaži
Trigliċeridi	Fosfataži alkalina
Nitroġenu tal-urea tad-demm	Potassju
Bilirubina totali	Sodju
Kreatinina	Kalċju
Proteina totali	Fosforu
Albumina	Klorur
Globulina	

Analiżi tal-awrina (fakultattiva)	
Dehra (lewn u turbidità)	Proteina totali
Volum	Glukożju
Gravità speċifika jew ożmolalità	Demm/ċelluli tad-demm
pH	

(*) Minħabba li perjodu ta' sawm fit-tul jista' jintroduċi parzjalità fil-kejl tal-glukożju għall-annimali ttrattati ma' dawk ta' kontroll, id-direttur tal-istudju għandu jiddetermina jekk ikunx sewwa li jsajjem lill-annimali. Jekk jintuża perjodu ta' sawm, dan għandu jkun adattat għall-ispeċi użata; għall-far dan jista' jkun 16-il siegħa (sawm tul il-lejl). Id-determinazzjoni ta' glukożju għas-sawm tista' ssir wara sawm tul il-lejl matul l-aħħar ġimgħa ta' espożizzjoni, jew wara sawm tul il-lejl qabel awtopsja (f'dan l-aħħar każ flimkien mal-parametri patoloġiċi kliniċi l-oħra kollha).

▼M4

39. Meta jkun hemm evidenza li s-sistema respiratorja inferjuri (jiġifieri, l-alveoli) tkun is-sit primarju ta' depożizzjoni u ritenzjoni, f'dak il-każ il-ħasil tal-bronkoalveolari (BAL) jista' jkun it-teknika ta' għażla biex ikunu analizzati kwantitattivament parametri b'effett ta' doża abbażi ta' ipoteżi li jiffokaw fuq alveolitis, infjammazzjoni pulmonari, u fosfolipidożi. Dan jippermetti li jkunu investigati sewwa bidliet ta' doża-rispons u ta' perkors ta' żmien meta jkun hemm ħsara alveolari. Il-fluwidu BAL jista' jkun analizzat għal għedud totali u differenzjali ta' lewkoċiti, proteina totali u deidroġenaži lattat. Parametri oħra li jistgħu jitqiesu huma dawk li jindikaw ħsara liżosomali, fosfolipidożi, fibroži u infjammazzjoni irritanti jew allerġika li tista' tinkludi d-determinazzjoni ta' ċitokines/kejmokines proinfjammatorji. Il-kejlijiet BAL ġeneralment jikkumplimentaw ir-riżultati minn eżamijiet ta' istopatoloġija iżda ma jistgħux jeħdulhom posthom. Gwida dwar kif isir ħasil tal-pulmuni tinsab f'GD 39 (2).

EŻAMI OFTALMOLOĠIKU

40. Bl-użu ta' oftalmoskopju jew apparat ekwivalenti, eżamijiet oftalmoloġiċi tal-fundus, tal-medja refrattiva, tal-iris u tal-konġuntiva għandhom isiru għall-annimali kollha qabel l-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, u għal gruppi kollha ta' konċentrazzjoni għolja u ta' kontrolli fit-tmiem. Jekk jinstab li jkun hemm bidliet fl-għajnejn, l-annimali kollha fil-gruppi l-oħra għandhom ikunu eżaminati, inkluż il-grupp satellitarju (riversibbiltà).

PATOLOĠIJA MAKROSKOPIKA U PIŻIJIET TA' ORGANI

41. L-annimali kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jitneħħew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal żvinar sħiħ (jekk ikun jista' jsir) u għal awtopsja makroskopika. Il-ħin bejn it-tmiem tal-aħħar espożizzjoni ta' kull annimal u meta jinqatel għandu jiġi rreġistrat. Jekk ma tkunx tista' ssir awtopsja minnufih wara li jkun instab annimal mejjet, l-annimal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperatura baxxa biżżejjed biex tkun imminimizzata l-awtoliżi. L-awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopiċi kollha għandhom jiġu rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.

42. It-Tabella 2 telenka l-organi u t-tessuti li għandhom ikunu ppreservati f'midjum adattat matul awtopsja makroskopika għal eżami istopatoloġiku. Il-preservazzjoni tal-organi u tat-tessuti [mqegħdin flimkien] u ta' kull organu u tessut ieħor tkun fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. L-organi mitkubin b'**tipa grassa** għandhom jintraqmu u jintiżnu mxarbin malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni biex ikun evitat it-tnixxif. It-tirojde u l-epididimi għandhom jintiżnu biss jekk ikun meħtieġ minħabba li ċ-ċelloli mill-irqim jistgħu jfixklu l-evalwazzjoni istopatoloġika. It-tessuti u l-organi għandhom jitqiegħdu f'10 % ta' formalina newtralizzata jew f'fissattiv adattat ieħor malli ssir l-awtopsja, u mhux f'anqas minn 24-48 siegħa qabel l-irqim skont il-fissattiv li għandu jintuża.

▼M4

Tabella 2

Organi u Tessuti Ippreservati Matul Awtopsja Makroskopika

Adrenali	Esofagu
Aorta	[Basla tax-xamm]
Mudullun tal-għadam (u/jew aspirat frisk)	**Ovarji**
Moħħ (inklużi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/meżoċefalu)	Frixa
Il-musrana l-għamja	Paratirojdi
Il-musrana l-ħoxna	Nerv periferali (xjatiku jew tibjali, preferibbilment qrib muskolu)
Duwodenu	Pitwitarja
[**Epididimi**]	Prostata
[Għajnejn (retina, nerv ottiku) u tebqiet l-għajnejn]	Il-musrana d-dritta
Wirk u l-għadma tar-riġel	Glandoli tal-bżieq
Il-bużżieqa tal-marrara (fejn ikun hemm)	Bżieżaq seminali
[Glandoli ta' Harder]	Ġilda
Qalb	Nerv vertebrali (ċervikali, midtoraċiku u lumbari)
Ileu	**Milsa**
Jejunum	Sternu
Kliewi	Stonku
[Glandoli tad-dmugħ (straorbitali)]	Snien
Laringi (3 livelli inkluża l-bażi tal-epiglotta)	**Testikoli**
Fwied	**Timu**
Pulmun (id-denduliet kollha f'livell wieħed, inklużi l-bronki ewlenin)	**Tirojdi**
Nodi limfatiċi mir-reġjun ilarju tal-pulmun, speċjalment għal kimiċi f'partiċelli għall-ittestjar li ftit jinħallu. Għal eżamijiet u/jew studji aktar fil-fond b'fokus immunoloġiku, jistgħu jitqiesu nodi limfatiċi addizzjonali, eż. dawk mir-reġjuni medjastinali, ċervikali/submandibulari u/jew awrikulari.	[Lsien]
Nodi limfatiċi (distali mill-portal ta' dħul)	Trakea (mill-anqas 2 livelli inklużi taqsima 1 lonġitudinali tul il-karina u taqsima 1 trasversali)
Glandola mammarja (mara)	[Ureteru]
Muskolu (koxxa)	[Uretra]
Tessuti nażofaringali (mill-anqas 4 livelli; 1 livell biex jinkludi l-kanal nażofaringali u t-Tessut Limfojde b'Assoċjazzjoni Nażali (NALT))	Bużżieqa tal-awrina
	Utru
	Organu mmirat
	Il-leżjonijiet u l-mases kollha kbar

▼M4

43. Il-pulmuni għandhom jitneħħew intatti, jintiżnu u jiddaħħlu b'fissattivi adatti bi pressjoni ta' 20-30 cm ta' ilma biex ikun żgurat li tinżamm l-istruttura tal-pulmuni (5). Għandhom jinġabru taqsimiet għad-denduliet kollha f'livell wieħed, inklużi l-bronki ewlenin, iżda jekk isir il-ħasil tal-pulmuni, id-dendula mhux maħsula għandha titqiegħed fit-taqsima bi tliet livelli (mhux taqsimiet tas-serje).

44. Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas 4 livelli tat tessuti nażofariġali, li wieħed minnhom għandu jinkludi l-kanal nażofariġali (5) (6) (7) (8) (9) biex jitħalla jsir eżami adegwat tal-epitelju mimli qxur, tranżizzjonali (respiratorju mhux vibrali), respiratorju (respiratorju vibrali) u tax-xamm, u tat-tessut limfatiku ta' tisfija (NALT) (10) (11). Għandhom ikunu eżaminati tliet livelli tal-lariġi, u wieħed minn dawn il-livelli għandu jinkludi l-bażi tal-epiglotta (12). Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas żewġ livelli tat-trakea, inkluża taqsima waħda longitudinali tul il-karina minn fejn il-bronki estrapulmonari jinqasmu fi tnejn u taqsima waħda trasversali.

ISTOPATOLOĠIJA

45. Evalwazzjoni istopatoloġika tal-organi u tat-tessuti kollha elenkati fit-Tabella 2 għandha ssir għall-gruppi ta' kontroll u ta' konċentrazzjoni għolja, u bħall-annimali kollha li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lis-sistema respiratorja, organi mmirati u leżjonijiet kbar. L-organi u t-tessuti li jkollhom leżjonijiet fil-grupp ta' konċentrazzjoni għolja għandhom ikunu eżaminati fil-gruppi kollha. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jagħmel evalwazzjonijiet istopatoliġiċi għal gruppi addizzjonali biex juri rispons ċar ta' konċentrazzjoni. Meta jintuża grupp satellitarju (riversibbli), għandha ssir evalwazzjoni istopatoloġika għat-tessuti u l-organi kollha identifikati bħala li jkunu juru effetti fil-gruppi ttrattati. Jekk ikun hemm għadd eċċessiv ta' mwiet bikrija jew problemi oħra fil-grupp ta' espożizzjoni għolja li jippreġudikaw is-sinifikat tad-dejta, il-konċentrazzjoni aktar baxxa li jkun imiss għandha tkun eżaminata istopatoloġikament. Għandu jsir sforz biex osservazzjonijiet gravi jitqabblu ma' sejbiet mikroskopiċi.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

46. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwali dwar il-piżijiet tal-ġisem, il-konsum ta' ikel, il-patoloġija klinika, il-patoloġija makroskopika, il-piżijiet tal-organi u l-istopatoloġija. Dejta dwar osservazzjonijiet kliniċi għandha tingħabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali użati, l-għadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali speċifiċi ta' tossiċità, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-ħin tal-mewt ta' kull annimal, deskrizzjoni u perkors ta' żmien ta' effetti tossiċi u riversibbiltà, u sejbiet minn awtopsji. Ir-riżultati kollha, kwantitattivi u inċidentali, għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika adattat. Jista' jintuża kull metodu ta' statistika ġeneralment aċċettat u l-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju.

Rapport tat-Test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skont il-każ:

Annimali tat-test u trobbija

— Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta.

▼M4

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far; Jistgħu jkunu pprovduti sors u dejta storika, jekk ikunu għal annimali esposti f'kundizzjonijiet simili ta' espożizzjoni, abitazzjoni u sawm.

— Għadd, età u sess tal-annimali.

— Metodu ta' każwalità.

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard.

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza, u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża isomerizzazzjoni).

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS), jekk ikunu magħrufa;

Vejjikolu

— Ġustifikazzjoni għal użu ta' vejjikolu u ġustifikazzjoni għal għażla tal-vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

— Dejta storika jew konkurrenti li turi li l-vejjikolu ma jfixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni dettaljata tal-kamra tal-inalazzjoni inkluż volum u dijagramma.

— Sors u deskrizzjoni ta' tagħmir użati għall-espożizzjoni tal-annimali kif ukoll għall-ġenerazzjoni tal-atmosfera.

— Tagħmir għall-kejl tat-temperatura, umdità, daqs ta' partiċelli u konċentrazzjoni attwali;

— Sors ta' arja u sistema użata għal kondizzjonament.

— Metodi użati għall-kalibrazzjoni ta' tagħmir biex tkun żgurata atmosfera omoġenea tat-test.

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva).

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieħer biss); post tat-tqegħid tal-annimali fil-kamra (ġisem kollu).

— Stabbiltà tal-atmosfera tat-test.

— Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u teħid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;

— Trattament ta' arja pprovduta/estratta.

— Rati ta' fluss tal-arja, rata ta' fluss ta' arja/port ta' espożizzjoni (mnieħer biss), jew toqol tal-annimali/kamra (ġisem kollu).

— Ħin għall-ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t95).

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli).

Dejta tal-espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni.

▼M4

— Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal ġol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra).

— Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-żona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal taħlitiet li jipproduċu forom fiżiċi etero-ġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament.

— Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (mg/l mg/m^3, eċċ.) milli f'unitajiet ta' volum (ppm, ppb, eċċ.).

— Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli, dijametru ajrudinamiku ta' medjan tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Analiżi waħda għal kull daqs ta' partiċelli għandha tkun irrappurtata.

Kundizzjonijiet tat-test

— Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kwalunkwe proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli ta' materjali solidi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar.

— Deskrizzjoni (preferibbilment inkluża dijagramma) tat-tagħmir użat biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test u biex l-annimali jkunu esposti għall-atmosfera tat-test.

— Dettalji tat-tagħmir użat biex jimmonitorja t-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss ta' arja fil-kamra (jiġifieri żvilupp ta' kurva ta' kalibrazzjoni).

— Dettalji tat-tagħmir użat biex jinġabru kampjuni għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-kamra u d-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli.

— Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u tal-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-teħid tal-kampjuni);

— Metodu ta' każwalità fl-assenjazzjoni ta' annimali lil gruppi ta' ttestjar u ta' kontroll.

— Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inklużi tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma).

— Il-motiv għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test.

Riżultati

— Tabulazzjoni tat-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss tal-arja.

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' konċentrazzjoni nominali u attwali tal-kamra.

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar id-daqs tal-partiċelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli u kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g.

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar rispons u ta' livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri, annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, iż-żmien meta jfaqqgħu u durata tal-effetti).

▼M4

— Tabulazzjoni tal-piżijiet individwali ta' kull annimal.

— Tabulazzjoni tal-konsum tal-ikel

— Tabulazzjoni ta' dejta ta' patoloġija klinika

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfażi partikolari għad-deskrizzjoni tal-metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-konċentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-partiċelli.

— Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni fil-partiċelli, meqjusin is-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-partiċelli ma setgħux jitħarsu;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probbbali tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati.

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm ħtieġa li b'mod uman jinqatlu annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).

— L-organu/i mmirat(i) għandu/hom jiġi/u identifikat/i.

— NOAEL u LOAEL għandhom ikunu ddeterminati.

LETTERATURA:

(1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP u Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-Ittestjar: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

B.30. STUDJI DWAR TOSSIĊITÀ KRONIKA

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 452 (2009) tal-OECD. It-TG 452 oriġinali kienet adottata fl-1981. L-iżvilupp ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.30 rivedut tqies li kien meħtieġ biex jirrifletti żviluppi reċenti fil-qasam tat-trattament xieraq tal-annimali u ta' rekwiżiti regolatorji (1) (2) (3) (4). L-aġġornament ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.30 twettaq flimkien ma' reviżjonijiet tal-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness: Studji dwar il-Karċinoġeniċità u tal-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness, Studji Kombinati dwar Tossiċità Kronika/karċinoġeniċità, bil-għan li jinkiseb tagħrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jingħataw aktar dettalji dwar l-għażla tad-doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgħa ta' kimiċi, inkluż pestiċidi u kimiċi industrijali.

2. Il-maġġoranza tal-istudji dwar tossiċità kronika jsiru fi speċijiet ta' rodituri, u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, maħsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu meħtieġa fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, il-prinċipji u l-proċeduri li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, flimkien ma' dawk li l-profil tagħhom jinsab fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (5), jistgħu wkoll ikunu applikati, b'modifiki xierqa, skont il-profil tagħhom fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD dwar Tfassil u Twettiq ta' Studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (6).

3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar tossiċità kronika huma orali, dermali u ta' inalazzjoni. L-għażla tar-rotta ta' amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tal-kimika għall-ittestjar u mir-rotta predominanti ta' espożizzjoni umana. Informazzjoni addizzjonali dwar l-għażla ta' rotta ta' espożizzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD (6).

4. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiffoka fuq espożizzjoni permezz tar-rotta orali, ir-rotta li komunement l-aktar li tintuża fi studji dwar tossiċità kronika. Filwaqt li studji fit-tul dwar tossiċità kronika li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotot dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu meħtieġa għall-valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħħa tal-bniedem u/jew jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji, iż-żewġ rotot ta' espożizzjoni jinvolvu kumplessità teknika konsiderevoli. Studji bħal dawn ikun jeħtiġilhom jitfasslu abbażi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika b'amministrazzjoni orali jista' jifforma l-bażi ta' protokoll għal studji dwar inalazzjoni u/jew dermali, fir-rigward ta' rakkomandazzjonijiet għal perjodi ta' trattament, parametri kliniċi u patoloġiċi, eċċ. Hemm gwida tal-OECD dwar l-amministrazzjoni ta' kimiċi għall-ittestjar bir-rotot ta' inalazzjoni (6) (7) u dermali (6). Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (8) u l-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (9), flimkien mad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar ittestjar ta' inalazzjoni akuta (7), għandhom ikunu kkonsultati b'mod speċifiku fit-tfassil ta' studji għal tul itwal ta' żmien li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta tal-inalazzjoni. Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (10) għandu jkun ikkonsultat fil-każ ta' ttestjar magħmul bir-rotta dermali.

▼M4

5. L-istudju dwar tossiċità kronika jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalgħu minn espożizzjoni ripetuta tul parti konsiderevoli mill-ħajja kollha tal-ispeċi użata. L-istudju għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tossiċi tal-kimika għall-ittestjar; jindika organi mmirati u l-possibbiltà ta' akkumulazzjoni. Jista' jipprovdi wkoll stima tal-livell bla effett ħażin osservat li tista' tintuża biex ikunu stabbiliti kriterji ta' sikurezza għal espożizzjoni umana. Qed issir enfażi wkoll dwar il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi li jixirqu tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.

6. L-għanijiet tal-istudji koperti minn dan il-Metodu ta' Ttestjar jinkludu:

— L-identifikazzjoni tat-tossiċità kronika ta' kimika għall-ittestjar;

— L-identifikazzjoni tal-organi mmirati;

— Il-karatterizzazzjoni tar-relazzjoni ta' doża-rispons;

— L-identifikazzjoni ta' livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) jew punt ta' tluq biex tkun stabbilita Doża ta' Riferiment (BMD);

— It-tbassir ta' effetti ta' tossiċità kronika f'livelli ta' espożizzjoni umana;

— Il-forniment ta' dejta biex ikunu ttestjati ipoteżijiet dwar modalità ta' azzjoni (6).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

7. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossikoloġiċi ta' kimika għall-ittestjar, l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju, biex it-tfassil tal-istudju jiffoka fuq l-ittestjar b'aktar effiċjenza għall-potenzjal ta' tossiċità kronika u biex l-użu tal-annimali jkun mill-anqas. Informazzjoni li għandha tassisti fit-tifsila tal-istudju tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; kull informazzjoni dwar il-modalità ta' azzjoni; riżultati ta' kull test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli u dejta tossikoloġika dwar kimiċi relatati strutturalment; dejta tossikokinetika disponibbli (doża waħda u wkoll kinetika ta' doża ripetuta meta tkun disponibbli) u dejta derivata minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjonijiet. Id-determinazzjoni ta' tossiċità kronika għandha ssir biss wara li tkun inkisbet informazzjoni inizjali dwar tossiċità minn doża ripetuta għal 28 jum u/jew minn testijiet ta' tossiċità għal 90 jum. Approċċ ta' ttestjar f'fażijiet għal ittestjar ta' tossiċità kronika għandu jitqies bħala parti mill-valutazzjoni globali tal-effetti potenzjali ħżiena għas-saħħa ta' kimika partikolari għall-ittestjar (11) (12) (13) (14).

8. Il-metodi ta' statistika l-aktar adatti għall-analiżi ta' riżultati, meqjusin it-tifsila u l-għanijiet sperimentali, għandhom ikunu stabbiliti qabel ma jingħata bidu għall-istudju. Kwistjonijiet li għandhom jitqiesu jinkludu jekk l-istatistika għandhiex tinkludi aġġustament għal sopravivenza u analiżi fil-każ ta' tmiem ħesrem ta' grupp wieħed jew aktar. Gwida dwar l-analiżi xierqa ta' statistika u referenzi ewlenin għal metodi ta' statistika aċċettati internazzjonalment jingħataw fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6), u wkoll fid-Dokument ta' Gwida Nru 35 dwar l-analiżi u l-evalwazzjoni ta' studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (15).

▼**M4**

9. Meta jkun qed isir studju dwar tossiċità kronika, il-prinċipji u l-konsiderazzjonijiet ta' gwida li l-profil tagħhom jinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 19 tal-OECD dwar l-għarfien, il-valutazzjoni u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem b'mod uman għal annimali għall-esperimenti użati f'evalwazzjoni tas-sikurezza (16), b'mod partikolari l-paragrafu 62 tiegħu, għandhom ikunu segwiti dejjem. Dan il-paragrafuq jiddikjara li "*Fi studji li jinvolvu dożaġġ ripetut, meta annimal juri sinjali kliniċi li huma progressivi, u jwasslu għal iktar deterjorament fil-kundizzjoni, għandha tittieħed deċiżjoni infurmata dwar jekk l-annimal għandux jinqatel b'mod uman jew le. Id-deċiżjoni għandha tinkludi konsiderazzjoni tal-valur tal-informazzjoni li għandha tinkiseb mill-manutenzjoni kontinwata ta' dak l-annimal fl-istudju, relattiv għall-kundizzjoni ġenerali tiegħu. Jekk tittieħed deċiżjoni biex l-annimal jibqa fit-test, il-frekwenza tal-osservazzjonijiet għandha tiżdied, skont il-bżonn. Jista' jkun possibbli wkoll, mingħajr ma jaffettwa b'mod avvers l-iskop tat-test, li d-dożaġġ jieqaf temporanjament jekk dan ħa jtaffi l-uġigħ jew l-iskumdità, jew li tonqos id-doża tat-test.*"

10. Gwida dettaljata u diskussjoni dwar il-prinċipji tal-għażla ta' doża għal studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6), kif ukoll f'żewġ pubblikazzjonijiet tal-Internazzjonali Life Sciences Institute (17) (18). L-istrateġija bażika tal-għażla tad-doża tkun tiddependi mill-għan jew għanijiet primarji tal-istudju (il-paragrafu 6). Fl-għażla ta' livelli xierqa ta' doża, għandu jinkiseb bilanċ bejn tgħarbil ta' perikli minn naħa waħda u karatterizzazzjoni ta' risponsi għal dożi baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naħa l-oħra. Dan huwa partikolarment rilevanti fis-sitwazzjoni fejn ikollu jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness) (il-paragrafu 11).

11. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness), milli eżekuzzjoni separata ta' studju dwar tossiċità kronika (dan il-Metodu ta' Ttestjar B.30) u studju tal-karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness). It-test konġunt jipprovdi aktar effiċjenza fir-rigward ta' ħin u spejjeż imqabblin ma' meta jsiru żewġ studji separati, mingħajr ħsara għall-kwalità tad-dejta fil-fażi kronika jew fil-fażi ta' karċinoġeniċità. Iżda għandhom jitqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 9 u 20-25) meta jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness), u huwa rikonoxxut ukoll li jistgħu jkunu meħtieġa studji separati f'ċerti oqfsa regolatorji.

12. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6).

PRINĊIPJU TAT-TEST

13. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'doži gradwati lil diversi gruppi ta' annimali għall-esperimenti, normalment għal perjodu ta' 12-il xahar, għalkemm jistgħu jintgħażlu wkoll perjodi itwal jew aqsar skont rekwiżiti regolatorji (ara l-paragrafu 33). Dan il-perjodu jintgħażel li jkun twil biżżejjed biex kull effett ta' tossiċità kumulattiva jsir jidher, mingħajr l-effetti ta' taħwid ta' bidliet ġerjatriċi. Devjazzjonijiet minn perjodu ta' espożizzjoni ta' 12-il xahar għandhom ikunu ġġustifikati, l-aktar fil-każ ta' perjodi aqsar. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata bir-rotta orali għalkemm l-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni jew dermali jista' wkoll ikun adattat. It-tifsila tal-istudju tista' tinkludi wkoll qatla interim waħda jew aktar, eż. fit-3 jew fis-6 xahar, u jistgħu jkunu inklużi gruppi addizzjonali ta' annimali biex dan isir (ara l-paragrafu 19). Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

▼M4

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimali

14. Dan il-Metodu ta' Ttestjar primarjament ikopri l-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika f'rodituri (ara l-paragrafu 2), għalkemm huwa rikonoxxut li studji simili f'annimali mhux rodituri jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji. L-għażla ta' speċi għandha tkun iġġustifikata. It-tfassil u t-twettiq ta' studji dwar tossiċità kronika fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, meta jkunu meħtieġa, għandhom ikunu bbażati fuq il-prinċipji li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar flimkien ma' dawk fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness, Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (5). Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' speċi u razza hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6).

15. F'dan il-Metodu ta' Ttestjar, l-ispeċi ppreferuta ta' rodituri huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' rodituri, eż. il-ġurdien. Firien u ġrieden kienu l-mudelli ppreferuti għall-esperimenti minħabba l-ħajja relattivament qasira tagħhom, l-użu kbir li jsir minnhom fi studji farmakoloġiċi u tossikoloġiċi, is-suxxettibbiltà tagħhom għal induzzjoni ta' tumur u li minnhom hemm razez karatterizzati biżżejjed. Bħala konsegwenza ta' dawn il-karatteristiċi, hemm ammont kbir ta' informazzjoni dwar il-fiżjoloġija u l-patoloġija tagħhom. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju dwar tossiċità kronika għandu jkun magħmul f'annimali mill-istess razza u sors bħal dawk użati fi studju/i preliminari dwar tossiċità li jdum(u) anqas. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf

16. L-annimali jistgħu jitqiedu jabitaw individwalment, jew jitqiegħdu f'gaġeġ fi gruppi żgħar tal-istess sess; abitazzjoni individwali għal kull annimal għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (19) (20) (21). Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minħabba t-tqegħid ta' gaġeġ. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx 70 % minbarra matul il-ħasil tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. Id-dieta għandha tissodisfa l-ħtiġijiet nutrizzjonali kollha tal-ispeċi ttestjata u l-kontenut ta' kontaminanti tad-dieta, inklużi iżda mhux limitatament għal residwi ta' pestiċidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestroġeni, metalli tqal u mikotossini, li jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultat tat-test, għandu jkun baxx kemm jista' jkun. Informazzjoni analitika dwar il-livelli ta' kontaminanti tan-nutrijent u tad-dieta għandha tkun iġġenerata perjodikament, mill-anqas fil-bidu tal-istudju u meta jkun hemm bidla fil-lott użat, u għandha tkun inkluża fir-rapport finali. Bl-istess mod għandha tkun ipprovduta informazzjoni analitika dwar l-ilma tax-xorb użat fl-istudju. L-għażla ta' dieta tista' tkun influwenzata mill-ħtieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-ħtiġijiet nutrizzjonli tal-annimali meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tar-rotta tad-dieta.

Preparazzjoni tal-annimali

17. Għandhom jintużaw annimali f'saħħithom, li jkunu ġew akklimatizzati għal kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-anqas 7 ijiem li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. Fil-każ ta' rodituri, id-dożaġġ tal-annimali għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara ftim u akklimatazzjoni u preferibbilment qabel ma l-annimali jkun għandhom 8 ġimgħat. L-annimali tat-test għandhom ikunu kkaratterizzati fir-rigward ta' speċi, razza, sors, sess, piż u età. Malli jinbeda l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż għal kull sess

▼M4

tal-annimali użati għandha tkun minimali u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju tal-annimali kollha fl-istudju, separatament għal kull sess. L-annimali għandhom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. Wara l-każwalità, m'għandux ikun hemm differenzi sinifikanti fil-piżijiet medji tal-ġisem bejn gruppi f'kull sess. Jekk ikun hemm differenzi sinifikanti ta' statistika, f'dak il-każ il-proċedura ta' każwalità għandha tkun ripetuta, jekk ikun possibbli. Kull annimal għandu jkun assenjat numru ta' identifikazzjoni uniku, u jkun immarkat b'mod permanenti b'dan in-numru b'tatù, b'impjant ta' mikroċipp jew b'metodu ieħor adattat.

PROĊEDURA

Għadd u sess tal-annimali

18. Għandhom jintużaw iż-żewġ sessi. Għandu jintuża għadd suffiċjenti ta' annimali biex meta l-istudju jintemm ikun hemm annimali biżżejjed f'kull grupp għal evalwazzjoni bijoloġika u ta' statistika bir-reqqa. Għar-rodituri għandhom normalment jintużaw mill-anqas 20 annimal minn kull sess minn kull grupp f'kull livell ta' doża, filwaqt li għal annimali mhux rodituri huwa rrakkomandat minimu ta' 4 minn kull sess minn kull grupp. Fi studji li jinvolvu ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali addizzjonali f'kull grupp ta' doża biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha.

Provvediment għal qatliet interim, gruppi satellitarji u annimali sentinelli

19. L-istudju jista' jagħmel provvediment għal qatliet interim (mill-anqas 10 annimali/sess/grupp), eż. kull sitt xhur, biex jagħti informazzjoni dwar il-progressjoni tal-bidliet tossikoloġiċi u informazzjoni mekkanistika, jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Fejn diġà jkun hemm informazzjoni bħal din mill-istudji preċedenti ta' tossiċità ta' doża ripetuta dwar il-kimika għall-ittestjar, qatliet interim jistgħu ma jkunux xjentifikament ġustifikati. Gruppi satellitarji jistgħu wkoll ikunu inklużi biex jimmonitorjaw ir-riversibbiltà ta' kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata; dawn normalment ikunu ristretti għall-ogħla livell ta' doża tal-istudju flimkien ma' kontroll. Jista' wkoll ikun inkluż grupp addizzjonali ta' annimali sentinelli (tipikament 5 annimali għal kull sess) għall-monitoraġġ ta' stat ta' mard, jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju (22). Jekk ikunu ppjanati qatliet interim jew li jiddaħħlu gruppi satellitarji jew ta' sentinelli, l-għadd ta' annimali inklużi fit-tifsila tal-istudju għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimalii li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Dawn l-annimali għandhom normalment isirulhom l-istess osservazzjonijiet, inkluż il-piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma, il-kejlijiet ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika u investigazzjonijiet patoloġiċi bħall-annimali fil-faża ta' tossiċità kronika tal-istudju ewlieni, għalkemm jista' wkoll ikun hemm provvediment (fil-gruppi ta' qtil interim) biex il-kejlijiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità.

Gruppi ta' dożi u dożaġġ

20. Gwida dwar l-aspetti kollha ta' għażla ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6). Mill-anqas għandhom jintużaw tliet livelli ta' doża u kontroll konkurrenti, ħlief meta jsir test ta' limitu (ara l-paragrafu 27). Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

▼**M4**

21. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, normalment għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex ikunu identifikati l-organi prinċipali u l-effetti tossiċi filwaqt li jkunu evitati tbatija, tossiċità severa, morbidità jew mewt. Filwaqt li jitqiesu l-fatturi li l-profil tagħhom jinsab fil-paragrafu 22 hawn taħt, għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex jislet evidenza ta' tossiċità, kif ikun jidher, pereżempju, minn tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-ġisem (madwar 10 %).

22. Iżda, skont x'ikunu l-għanijiet tal-istudju (ara l-paragrafu 6), tista' *tintgħażel l-ogħla doża anqas mid-doża* li tipprovdi evidenza ta' tossiċità, *eż. jekk doża tislet effett avvers ta' tħassib iżda li madankollu jkollha ftit impatt fuq il-ħajja jew il-piż tal-ġisem. L-ogħla*doża m'għandhiex tkun aktar minn 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum (doża ta' limitu, ara l-paragrafu 27).

23. Jistgħu jintgħażlu livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża biex ikunu stabbiliti doża-rispons u NOAEL jew riżultat maħsub ieħor tal-istudju, eż. BMD (ara l-paragrafu 25) fil-livell ta' doża l-aktar baxx. Fatturi li għandhom jitqiesu fl-għoti ta' dożi aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-dożi li fihom jistgħu jseħħu bidliet importanti fil-metaboliżmu jew il-modalità ta' azzjoni tossika, fejn ikun mistenni limitu, jew fejn ikun mistenni punt ta' tluq għal estrapolazzjoni ta' doża baxxa.

24. L-ispazjar magħżul ta' livelli ta' doża jkun jiddependi mill-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar, u ma jistax ikun preskritt f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, iżda intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss jipprovdu prestazzjoni tajba ta' test meta jintużaw biex ikunu stabbiliti l-livelli minn fuq għal isfel ta' dożi, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' test sikwit hija preferibbli mill-użu ta' intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' madwar 6-10) bejn dożaġġi. B'mod ġenerali l-użu ta' fatturi akbar minn 10 għandu jkun evitat, u għandu jkun iġġustifikat jekk ikun applikat.

25. Kif spjegat aktar fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6), il-punti li għandhom jitqiesu fl-għażla ta' doża jinkludu:

— Nonlinearitajiet magħrufin jew suspettati jew punti ta' infezzjoni fid-doża-rispons;

— Tossikokinetika u firxa ta' dożi fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn dożi esterni u interni jseħħu jew ma jseħħux;

— Leżjonijiet prekursuri, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;

— Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta' modalità ta' azzjoni, bħal dożi li fihom tibda tfaqqa' ċ-ċitotossiċità, livelli ta' ormoni jitħawdu, mekkaniżmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;

— Reġjuni tal-kurva ta' doża-rispons fejn tkun meħtieġa stima partikolarment robusta, eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;

— Konsiderazzjoni ta' livelli antiċipati ta' espożizzjoni umana.

▼M4

26. Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta' kontroll ta' vejjikoli jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Ħlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom ikunu maniġġati b'mod identiku bħal dawk fil-gruppi tat-test. Jekk jintuża vejjikolu, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-ogħla volum użat fost il-gruppi ta' doża. Jekk kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, u tikkawża li jittieħed anqas ikel tad-dieta b'mod sinifikanti minħabba dieta b'anqas palat, grupp ta' kontroll addizzjonali ta' tmigħ lil pari jista' jkun utli biex iservi ta' kontroll aktar adattat.

27. Jekk jista' jkun anticipat, abbażi ta' informazzjoni minn studji preliminari, li test f'livell ta' doża waħda, ekwivalenti għal mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum, billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, aktarx ma jipproduċix effetti ħżiena u ma tkunx mistennija tossiċità abbażi ta' dejta minn kimiċi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju sħiħ bl-użu ta' tliet livelli ta' doża jista' ma jitqisx li jkun meħtieġ. Jista' jkun japplika limitu ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum ħlief meta espożizzjoni umana tindika l-ħtieġa li jkollu jintuża livell ogħla ta' doża.

Preparazzjoni ta' doži u amministrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar

28. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata oralment, permezz tad-dieta jew ilma tax-xorb, jew b'gavage. Informazzjoni addizzjonali dwar rotot u metodi ta' amministrazzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6). Ir-rotta u l-metodu ta' amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-għan tal-istudju, mill-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mid-disponibbiltà bijoloġika tagħha u mill-metodu ta' espożizzjoni umana. Għandu jkun ipprovdut motiv għar-rotta magħżula u għall-metodu ta' amministrazzjoni. Fl-interessi ta' trattament xieraq tal-annimali, gavage orali għandu normalment jintgħażel biss għal dawk l-aġenti li għalihom din ir-rotta u l-metodu ta' amministrazzjoni raġonevolment jirrappreżentaw espożizzjoni potenzjali umana (eż. farmaċewtiċi). Għal kimiċi ta' dieta jew ambjentali inklużi pestiċidi, l-amministrazzjoni tipikament issir permezz tad-dieta jew b'ilma tax-xorb. Iżda, għal xi xenarji, eż. espożizzjoni okkupazzjonali, amministrazzjoni permezz ta' rotot oħra tista' tkun aktar adattata.

29. Meta jkun meħtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinħall jew tiġi sospiża f'vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u addittivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprjetajiet kimiċi tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u effetti fuq l-ikel jew fuq il-konsum tal-ilma jew fuq l-istat nutrizzjonali tal-annimali. Huwa rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jitqies l-użu ta' soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, u wara titqies soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'vejjikoli oħra. Għal vejjikoli oħra minbarra ilma, il-karatteristiċi tossiċi tal-vejjikolu għandhom ikunu magħrufa. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar l-istabbiltà tal-kimika għall-ittestjar u l-omoġeneità ta' soluzzjonijiet ta' dożaġġ jew dieti (kif jixraq) skont il-kundizzjonijiet ta' amministrazzjoni (eż. dieta).

30. Għall-kimiċi amministrati permezz tad-dieta jew l-ilma tax-xorb, huwa importanti jkun żgurat li l-kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Fi studji fit-tul dwar tossiċità bl-użu ta' amministrazzjoni ta' dieta, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-għalf m'għandhiex tkun aktar 'il fuq mil-limitu ta' 5 % tad-dieta totali, biex ikunu evitati żbilanċi nutrizzjonali. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw jew konċentrazzjoni kostanti ta' dieta (mg/kg dieta jew ppm) jew livell wieħed kostanti ta' doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgħa. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼M4

31. Fil-każ ta’ amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-ġimgħa), normalment għal perjodu ta’ 12-il xahar (ara wkoll il-paragrafu 33), għalkemm jista’ jkun meħtieġ perjodu itwal skont rekwiżiti regolatorji. Kull reġim ieħor ta’ dożaġġ, eż. ħamest ijiem fil-ġimgħa, jeħtieġlu jkun iġġustifikat. Fil-każ ta’ amministrazzjoni dermali, annimali jkunu normalment ittrattati bil-kimika għall-ittestjar għal mill-anqas 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, kif speċifikat fil-Kapitolu B.9 ta’ dan l-Anness (10), għal perjodu ta’ 12 xahar. Espożizzjoni bir-rotta tal-inalazzjoni ssir għal 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, iżda tista’ tintuża wkoll espożizzjoni għal 5 ijiem fil-ġimgħa, jekk dan ikun ġustifikat. Il-perjodu ta’ espożizzjoni jkun normalment għal perjodu ta’ 12 xahar. Jekk speċijiet ta’ rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta’ espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta tintuża espożizzjoni li ddum anqas minn 6 sigħat kuljum. Ara wkoll il-Kapitolu B.8 ta’ dan l-Anness (8).

32. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b’gavage lill-annimali dan għandu jsir billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta’ intubazzjoni adattat, f’ħinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża waħda darba kuljum, meta pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista’ jkun possibbli li tinżamm ir-rata ta’ doża kuljum billi din tkun amministrata bħala doża maqsuma (darbtejn kuljum). Il-volum massimu ta’ likwidu li jkun jista’ jiġi amministrat f’waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum għandu jinżamm baxx daqs kemm ikun prattikabbli, u normalment m’għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem għal rodituri (22). Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistgħu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jeħtiġilhom jiġu dilwiti biex ikunu evitati effetti lokali severi. Ittestjar f’konċentrazzjonijiet li x’aktarx ikunu korrużivi jew irritanti għas-sistema gastrointestinali għandu jkun evitat.

Durata tal-istudju

33. Filwaqt li dan il-Metodu ta’ Ttestjar huwa mfassal primarjament bħala studju ta’ 12-il xahar dwar tossiċità kronika, it-tifsila tal-istudju tippermetti wkoll u tista’ tkun applikata għal studji jew li jdumu anqas (eż. 6 jew 9 xhur) jew aktar (eż. 18 jew 24 xahar), skont ir-rekwiżiti ta’ reġimi regolatorji partikolari jew għal għanijiet mekkanistiċi speċifiċi. Devjazzjonijiet minn espożizzjoni li ddum 12-il xahar għandhom ikunu ġġustifikati, l-aktar fil-każ ta’ dawk li jdumu anqas. Gruppi satellitarji inklużi għall-monitoraġġ tar-riversibbiltà ta’ kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata għandhom jinżammu mingħajr dożaġġ għal perjodu ta’ mhux anqas minn 4 ġimgħat u ta’ mhux aktar minn terz ta’ kemm idum l-istudju totali wara li tkun intemmet espożizzjoni. Gwida ulterjuri, inkluża konsiderazzjoni ta’ sopravivenza fl-istudju, hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (6).

OSSERVAZZJONIJIET

34. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbidità jew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u t-tmiem ta’ kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. Osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-anqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin(ijiet) kull jum, filwaqt li jitqies il-perjodu massimu ta’ effetti antiċipati wara dożaġġ fil-każ ta’ amministrazzjoni b’gavage.

▼M4

35. Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru fuq l-annimali kollha mill-anqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (biex jitħallew isiru paraguni skont is-suġġett), fi tmiem l-ewwel ġimgħa tal-istudju u kull xahar minn hemm ‘il quddiem. Il-protokoll għal osservazzjonijiet għandu jkun magħmul b’mod li varjazzjonijiet bejn osservaturi individwali jkunu mminimizzati u indipendenti minn grupp ta’ test. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra mill-gaġġa ta’ abitazzjoni, preferibbilment f’arena standard u f’ħinijiet simili għal kull jum f’kull okkażjoni. Huma għandhom ikunu rreġistrati sewwa, preferibbilment billi jintużaw sistemi ta’ punti, iddefiniti espliċitament mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandhom isiru sforzi biex ikun żgurat li varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta’ osservazzjoni jkunu minimi. Sinjali nnotati għandhom jinkludi, iżda ma jkunux limitati għal, bidliet fil-ġilda, pil, għajnejn, membrani mukuża, okkorrenza ta’ sekrezzjonijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż. tidmigħ, erezzjoni tal-pil, daqs tal-pupilli, u xejra respiratorja mhux tas-soltu). Bidliet fil-mixja, qagħda u rispons għal immaniġġar, kif ukoll il-preżenza ta’ movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv) jew imġiba biżarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b’lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (24).

36. Eżami oftalmoloġiku, bl-użu ta’ oftalmoskopju jew tagħmir ieħor adattat, għandu jsir fuq l-annimali kollha qabel l-ewwel amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Fit-tmiem tal-istudju, dan l-eżami għandu preferibbilment isir għall-annimali kollha iżda mill-anqas fid-doża għolja u fil-gruppi ta’ kontroll. Jekk fl-għajnejn jinstabu bidliet relatati ma’ trattament, l-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati. Jekk analiżi strutturali jew informazzjoni oħra jissuġġerixxu tossiċità okulari, f’dak il-każ il-frekwenza ta’ eżami okulari għandha tiżdied.

37. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta’ tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti newrotossiċi, ikunu jistgħu jsiru b’mod fakultativ valutazzjoni ta’ reattività sensorja għal stimuli ta’ tipi differenti (24) (eż. stimuli tas-smigħ, viżivi u proprjoċettivi) (25), (26), (27), valutazzjoni tal-qawwa tal-qabda (28) u valutazzjoni tal-attività motorja (29) qabel il-bidu tal-istudju u f’perjodi ta’ 3 xhur wara li jkun beda l-istudju sa u inklużi 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar). Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi.

38. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta’ tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti immunotossiċi, investigazzjonijiet ulterjuri ta’ dan il-punt ta’ tmiem ikunu jistgħu jsiru b’mod fakultattiv fit-tmiem.

Piż tal-ġisem, konsum ta’ ikel/ilma u effiċjenza fl-ikel

39. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa, u mill-anqas kull xahar minn hemm ‘il quddiem. Il-kejlijiet ta’ konsum ta’ ikel u ta’ effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm ‘il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm ‘il quddiem meta l-kimika tkun amministrata fl-ilma tax-xorb. Għandhom jitqies wkoll kejlijiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

▼M4

Ematoloġija u bijokimika klinika

40. Fi studji li jinvolvu rodituri, għandhom isiru eżamijiet ematoloġiċi f'mill-anqas 10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp, kull 3, 6, u 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar), billi jintuża l-istess annimal il-ħin kollu. Għal ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha (ara l-paragrafu 18). Fi studji ta' annimali mhux rodituri, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'ħinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal rodituri. Il-kejlijiet kull 3 xhur, għal rodituri jew għal annimali mhux rodituri, jistgħu ma jsirux jekk ma jkunu dehru ebda effetti fuq parametri ematoloġiċi fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Għandhom jittieħdu kampjuni tad-demm minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardijaku jew minn sinus retroorbitali, b'anestesija.

41. Il-lista ta' parametri li ġejja għandha tkun investigata (30): Għadd total u differenzjali ta' lewkoċiti, għadd ta' eritroċiti, għadd ta' pjastrini, konċentrazzjoni ta' emoglobina, ematokrit (volum ta' ċelluli ppakkjati), volum korpuskulari medju (MCV), emoglobina korpuskulari medja (MCH), konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja (MCHC), ħin protrombin u ħin tromboplastin parzjali attivat. Parametri ematoloġiċi oħra bħal korpi ta' Heinz jew morfoloġija atipika oħra ta' eritroċiti jew metemoglobina jistgħu jitkejlu kif jixraq skont it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, għandu jkun adottat approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar. Jekk il-kimika għall-ittestjar ikollha effett fuq is-sistema ematopojetika, jistgħu jkunu indikati wkoll għedud ta' retikoloċiti u ċitoloġija tal-mudullun tal-għadam, għalkemm dawn għandhom isiru b'rutina.

42. Determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika għall-investigazzjoni ta' effetti tossiċi maġġuri f'tessuti u, speċifikatament, ta' effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demm miksubin minn mill-anqas 10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp fl-istess intervalli ta' ħin kif speċifikat għall-investigazzjonijiet ematoloġiċi, billi jintuża l-istess annimal il-ħin kollu. Għal ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika kollha meħtieġa. Fi studji ta' annimali mhux rodituri, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'ħinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal rodituri. Jistgħu ma jsirux kejlijiet kull 3 xhur għal rodituri jew għal annimali mhux rodituri jekk ma jkun deher ebda effett fuq parametri ta' bijokimika klinika fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Huwa rrakkomandat is-sawm matul il-lejn tal-annimalli (bl-eċċeżżjoni tal-ġrieden) qabel it-teħid tal-kampjuni tad-dehem. Il-lista ta' parametri li ġejja għandha tkun investigata (30): glukożju, urea (nitroġenu tal-urea), kreatinina, proteina totali, albumina, kalċju, sodju, potassju, kolesterol totali, mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatoċellulari (aminotransferaži tal-alanina, aspartate aminotransferaži, glutamat ta' deidroġenaži, aċidi totali tal-bili) (31), u mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatobiljari (fosfataži alkalina, gamma glutamil trasferimentaži, 5'-nukleotidaži, bilirubina totali, aċidi totali tal-bili) (31). Parametri oħra ta' bijokimika klinika bħal trigliċeridi sajmin, ormoni speċifiċi u kolinesteraži jistgħu jitkejlu kif jixraq, skont it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, hemm ħtieġa ta' approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar.

▼M4

43. Determinazzjonijiet ta' analiżi tal-awrina għandhom isiru fuq mill-anqas 10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp fuq kampjuni miġburin fl-istess intervalli bħal dawk għall-ematoloġija u l-kimika klinika. Ma jkunx meħtieġ isiru kejlijiet kull 3 xhur jekk ma jkun deher ebda effett fuq analiżi tal-awrina fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Il-lista ta' parametri li ġejja kienet inkluża f'rakkomandazzjoni esperta dwar studji ta' patoloġija klinika (30): dehra, volum, ożmolalità jew gravità speċifika, pH, proteina totali u glukożju. Determinazzjonijiet oħra jinkludu keton, urobilinoġenu, bilirubina u demm moħbi. Jistgħu jintużaw aktar parametri meta jkun meħtieġ biex tkun estiża l-investigazzjoni ta' effett(i) osservat(i).

44. Huwa meqjus b'mod ġenerali li jeħtieġu varjabbli bażi ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel trattament għal studji dwar il-klieb, iżda ma jeħtiġilhomx ikunu ddeterminati fi studji dwar rodituri (30). Iżda, jekk dejta bażi storika (ara l-paragrafu 50) ma tkunx adegwata, għandu jitqies li tkun iġġenerata dejta bħal din.

Patoloġija

Awtopsja makroskopika

45. L-annimali kollha fl-istudju normalment għandhom ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Iżda jista' wkoll ikun hemm provvediment (fil-qatla interim jew fi gruppi satellitarji) biex kejlijiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità (ara l-paragrafu 19). Dawn l-annimali jistgħu ma jkunux soġġetti għal awtopsja u għall-proċeduri sussegwenti deskritti fil-paragrafi li ġejjin. L-annimali sentinelli jista' jkun jeħtiġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju.

46. Pożijiet ta' organi għandhom jinġabru mill-annimali kollha, minbarra dawk eskluži bil-parti tal-aħħar tal-paragrafu 45. L-adrenali, il-moħħ, l-epididimi, il-qalb, il-kliewi, il-fwied, l-ovarji, il-milsa, it-testikoli, it-tirojde (jintiżnu wara fissazzjoni, ma' paratirojdi), u l-utru tal-annimali kollha (minbarra ta' dawk misjubin qed imutu u/jew qed jinqatlu fil-frattemp) għandhom jintraqmu minn kull tessut imwaħħal magħhom, kif jixraq, u l-piż tagħhom fl-imxarrab għandu jittieħed malajr kemm jista' jkun wara dissezzjoni biex ma jitħalliex ikun hemm inxif. Fi studju li juża l-ġrieden, l-użin tal-glandoli adrenali huwa fakultattiv.

47. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (32) (tessuti f'parenteżi kwadri huma fakultattivi):

il-leżjonijiet kbar kollha	qalb	frixa	stonku (il-parti quddimija tal-istonku, stonku glandolari)
glandola adrenali	ileu	glandola tal-paratirojde	[snien]
aorta	jejunum	nerv periferali	testikoli
moħħ (inkluži taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/meżoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugħ (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]

▼M4

glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-ħoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inklużi mnieħer, turbinati u sinus paranażali]	ġilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtoraċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vaġina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-għadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-għadam
Glandola ta' Harder			

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermali ta' amministrazzjoni, il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandhom ikunu ppreservati, u t-teħid ta' kampjuni speċifiċi u l-preservazzjoni tal-ġilda mis-sit ta' applikazzjoni huma essenzjali. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (8) u tal-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (9). Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

Istopatoloġija

48. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (32). L-eżamijiet istopatoloġiċi minimi għandhom ikunu:

— it-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;

— it-tessuti kollha minn annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;

— it-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi;

— tessuti mmirati jew tessuti li wrew bidliet relatati ma' trattament fil-grupp ta' doża għolja, mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;

— fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu eżaminati.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

49. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. Addizzjonalment, id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali fil-bidu tat-test, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kull mewta jew qatla b'mod uman, l-għadd ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż iż-żmien meta jibdew ifaqqgħu, durata u severità ta' kull effett tossiku, l-għadd ta' annimali li juru leżjonijiet, it-tip ta' leżjonijiet u l-perċentwali tal-annimali li juru kull tip ta' leżjoni. Tabelli ta' sommarji ta' dejta għandhom jipprovdu l-mezzi u d-devjazzjonijiet standard (għal dejta ta' test kontinwu) ta' annimali li juru effetti tossiċi jew leżjonijiet, minbarra l-gradazzjoni tal-leżjonijiet.

50. Dejta storika ta' kontroll tista' tkun siewja fl-interpretazzjoni tar-riżultati tal-istudju, eż. fil-każ meta jkun hemm indikazzjonijiet li d-dejta pprovduta mill-kontrolli konkurrenti tkun sostanzjalment diversa meta mqabbla ma' dejta reċenti minn annimali ta' kontroll mill-istess faċilità/kolonja tat-test. Dejta storika ta' kontroll, jekk tkun evalwata, għandha tkun sottomessa mill-istess laboratorju u tkun tirrelata ma' annimali tal-istess età u razza ġġenerati matul il-ħames snin li jkunu ġew qabel l-istudju inkwistjoni.

51. Meta jkunu applikabbli, riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-metodi ta' statistika u d-dejta li jkollha tiġi analizzata għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju (paragrafu 8). L-għażla għandha tipprovdi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun meħtieġ.

Rapport tat-test

52. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-Ittestjar:

— natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni;

— sors tal-kimika;

— numru tal-lott;

— ċertifikat tal-analiżi tal-kimika

Vejjikolu (fejn xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma).

Annimali tat-test:

— speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;

— għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;

▼M4

— sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;

— piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;

— meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;

— dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta;

— dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;

— rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieħer jew il-ġisem kollu;

— dożi attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), u fattur ta' konverżjoni minn konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (mg/kg jew ppm) ta' dieta/ilma tax-xorb għad-doża attwali, jekk applikabbli;

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Riżultati (għandhom ikunu ppreżentati sommarji tad-dejta tabulata u dejta dwar annimali individwali):

— dejta dwar sopravivenza;

— piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— konsum ta' ikel, kalkulazzjonijiet ta' effiċjenza fl-ikel, jekk ikunu saru, u konsum tal-ilma jekk applikabbli;

— dejta ta' reazzjoni tossika skont is-sess u livell ta' doża, inklużi sinjali ta' tossiċità;

— natura, inċidenza (u, jekk bil-punti, severità), u dewmien ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk hux tranżitorji jew permanenti);

— eżami oftalmoloġiku;

— testijiet ematoloġiċi;

— testijiet ta' bijokimika klinika;

— testijiet ta' analiżi tal-awrina;

— riżultat ta' kull investigazzjoni ta' newrotossiċità jew immunotossiċità

— piż terminali tal-ġisem;

— piżijiet ta' organi (u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli);

— sejbiet minn awtopsji;

— deskrizzjoni dettaljata tat-trattamenti kollha relatati ma' sejbiet istopatoloġiċi;

— dejta ta' assorbiment jekk disponibbli;

▼M4

Trattament ta' statistika ta' riżultati, kif jixraq

Diskussjoni dwar riżultati inklużi:

— Doża: relazzjonijeit ta' rispons

— Konsiderazzjoni ta' kwalunkwe informazzjoni dwar il-modalità tal-azzjoni

— Diskussjoni dwar kull approċċ ta' mudellar

— Determinazzjoni ta' BMD, NOAEL jew LOAEL

— Dejta storika ta' kontroll

— Rilevanza għall-bnedmin

Konklużjonijiet

LETTERATURA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(5) Il-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali dwar Doża Ripetuta għal 90 Jum ta' Test ta' Subtossiċità Kronika Orali f'Annimali Mhux Rodituri.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subakuta: Studju ta' 28 Jum.

(9) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subkronika: Studju ta' 90 Jum.

(10) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossiċità (Dermali) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Id-Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) 999-1003 Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendix 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼B

B.31. **STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ FL-IŻVILUPP PRENATALI**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 414 (2001).

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' l-ittestjar żviluppanti tat-tossiċità huwa iddisinjat li jipprovdi informazzjoni ġenerali li tikkonċerna l-effetti ta' l-espożizzjoni prenatalifuq annimal tqil waqt it-test u fuq l-organiżmu żviluppanti in utero; dan jista' jinkludi l-assessjar ta' l-effetti maternali kif ukoll il-mewt, anormalitjiet strutturali, jew it-tkabbir mibdul tal-fetu. Id-difetti funzjonali, għalkemm parti importanti fl-iżvilupp, ma humiex parti integrali ta' dan il-metodu tat-test. Dawn jistgħu ikunu ittestjati għal studju separat jew bħala żieda ma dan l-istudju bl-użu tal-metodu tat-test għal newrotossiċità ta' l-iżvilupp. Għall-informazzjoni dwar it-testijiet għal defiċjenzi funzjonali u l-effetti l-oħrajm ta' wara t-twelid, il-Metodu tat-Test għal studju tat-tossiċità riproduttiva ta' żewġ ġenerazzjonijiet u l-istudju għal newrotossiċità ta' l-iżvilupp għandu jkun ikkonsultat skond kif xieraq.

Dan il-metodu tat-test jista' jeħtieġ adattazzjoni speċifika f'każi individwali fuq il-bażi ta' tagħrif speċifiku fuq, eż. il-propjetajiet fiżikokimiċi jew tossikoloġiċi tas-sustanza tat-test. Tali adattazzjoni hija aċċettabbli, meta evidenza xjentifika konvinċenti tissuġġerixxi li l-adattazzjoni tkun twassal għal test aktar informattiv. F'tali każ, din l-evidenza xjentifika għandha tkun dokumentata bir-teqqa fir-rapport ta' l-istudju.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossikoloġijata' l-iżvilupp: l-istudju ta' l-effetti ħżiena fuq l-organiżmi ta' l-iżvilupp li jistgħu jirriżultaw mill-espożizzjoni qabel il-konċepiment, matul żvilupp ta qabel it-twelid, jew ta' wara t-twelid għaż-żmien mal-maturutà sesswali. Il-manifestazzjonijiet maġġuri tat-tossiċità ta' l-iżvilupp jinkludu, 1) il-mewt ta' l-organiżmu, 2) l-annormalità strutturali, 3) tibdil fit-tkabbir, u 4) defiċjenza funzjonali. It-tossikoloċija ta' l-iżvilupp kienet preċedentament ta' spiss referuta bħala teratolġija.

Effett ħażin: Kwalunkwe alterazzjoni relatata mat-trattament minn linja bażi li tnaqqas l-abbiltà ta' l-organiżmu li jibqa ħaj, li jirriproduċi jew li jadatta għall-ambjent. Fir-rigward tat-tossoloġija ta' l-iżvilupp, meqjusha fis-sens l-aktar wiesa, din tinkludi kwalunkwe effett li jinterferixxi mal-iżvilupp normali tal-conceptus, kemm qabel u wara t-twelid.

Tkabbir mibdul: Tibdil fl-organu naxxenti jew fil-piż tal-ġisem jew fid-daqs.

Alterazzjonijiet (annormalitajiet): Alterazzjonijiet strutturali fl-iżvilupp li jinkludu kemm il-malformazzjonijiet u wkoll varjazzjonijiet (28).

Malformazzjoni/Annormalità Maġġuri: Tibdil strutturali ikkunsidrat bħala detrimentali għall-annimal (jista' wkoll ikunu letali) u hija normalment rari.

▼B

Varjazzjoni/Annormalità Minuri: Tibdil strutturali meqjus bħala li jkollu ftit jew l-ebda effett strutturali fuq l-annimal; jista' jkun temporanju jew jista' jseħħ relattivament ta' spiss fil-popolozzjoni tal-kontroll.

Konċepiment: Is-summa tad-derivattivi ta' ovum fertilizzat fi kwalunkwe stadju ta' l-iżvilupp mill-fertilizzazzjoni sat-twelid, inklużi l-membrani extra-embrijoniċi kif ukoll l-embriju jew il-fetu.

Implantazzjoni (nidazzjoni): It-twaħħil tal-blastoċista ma l-inforra epiteljali ta' l-uteru, inkluż il-penetrazzjoni tagħha mill-epiteljum uterin, u t-twaħħil tagħha fil-endometrrijum.

Embriju: l-istadju kmieni jew żviluppanti ta' kwalunkwe organiżmu, speċjalment l-iżvilupp tal-prodott tal-fertilizzazzjoni tal-bajda wara l-assi t-twila tkun tidher u sakemm l-istrutturi magġuri kollha jkunu preżenti.

Embijotossiċità: Detrimentali għall-istruttura normali, l-iżvilupp, it-tkabbir, u/jew il-viabbilità ta' embrijun.

Fetu: Il-wild mhux imwieled fil-perjodu post-embrijoniku.

Fetutossiċità: Detrimentali għall-istruttura normali, l-iżvilupp, it-tkabbir, u/jew il-viabbilità tal-fetu.

Abort: It-twarrib ta' qabel il-waqt mill-uteru tal-prodotti tal-konċepiment: ta' l-embrijun jew ta' fetu mhux-viabbli/

Reżorpzjoni: Konċepiment li, wara li jkun ġie impjantant fl-uteru, sussegwentament imut u jkun, jew kien, assorbit mill-ġdid.

Reżorpzjoni kmieni: Evidenza ta' l-implant mingħajr embrijun/-fetu rikonoxxibbli.

Reżorpzjoni tard: Embrijun jew fetu mejjet b; tibdiliet esterni deġenerattivi.

NOAEL: Abbrevjazzjoni għal-livell ta' l-ebda effett avvers ma huwa osservabbli (no-observed-adverse-effect level) u hija l-għola doża jew livell ta' espożizzjoni meta l-ebda sejbiet avversi realatati mat-trattament ma jkunu osservati.

1.3. SUSTANZA TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Normalment, is-sustanzaa tat-test hija somministrata fuq annimali tqal għal mill-anqas mill-impjantazzjoni sa jum wieħed qabel il-jum skedat tal-qatla, li għandu jkun qrib kemm jista' jkun possibbli għall-jum normali tal-ħlas mingħajr ir-riskju ta' informazzjoni li tirriżulta minn ħlas kmieni. Il-metodu tat-test mhux intiż li jeżamina biss il-perjodu ta' lorganoġenesi, (eż. il-jiem 5-15 fl-annimal gerriema, u l-jiem 6-18 fil-fenek) imma wkoll l-effettu mill-pre-impjantazzjoni, meta xieraq, mutul il-perjodu kollu tal-ġestjoni sal-jum ta' qabel is-sezzjoni ċesarja. Ftit qabel is-sezzjoni ċesarjaa, il-femminili jkunu maqtula, il-kontenuti ta l-utru jkunu eżaminati, u l-fetu huma evalwati għan anomalitajiet esterni viżibbli u għal nisġiet rotob u tibdiliet skeletali.

▼B

1.5. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.5.1. **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

Huwa rrakkommandat li t-testijiet ikunu mwettqa fuq l-ispeċje l-aktar relevanti, u li l-ispeċje u r-razzez tal-laboratorju li huma normalment użati fit-testijiet dwar it-tossiċità fl-iżvilupp prenatali, jkunu użati. L-ispeċje ta' l-anniamli gerriema preferuta huja l-far u l-ispeċje ta' annimali mhux ġeggiema huwa l-fenek. Ġustifikazzjoni għandha tkun ipprovduta jekk ikun użat xi speċje ieħor.

1.5.2. **Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' fejn jinżammu l-annimali ta' l-esperiment għandha tkun 22 °C (± 3o) għall-annimali gerriema u 18 °C (± 3°) għall-fniek. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

Il-proċeduri ta' l-akkompanjament għandhom jitwettqu f'gaġġeġ adatti għal dak l-iskop. Meta gaġġeġ separati għall-annimali fl-akkompanjament huma preferuti, iż-żamma ta' numru żgħir f'ġagga waħda huwa wkoll aċċettabbli.

1.5.3. **Preparazzjoni ta' l-annimali**

Annimali b'saħħithom. Li jkunu ġew akklamatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mil anqas 5 ijiem u li ma jkunux ġew suġġetti għal proċeduri preċedenti sperimentali, għandhom ikunu użati. L-annimali tat-test għandhom ikunu karatterizzati bħala speċje, razza, sorsi, seww, piż u/jew l-età. L-annimali tal-gruppi kollha tat-test għandhom, kemm jista' jkun prattikabbli, ikunu ta' piż u età uniformi. Femmini adulti żgħażagħ li jkunu għadu ma weldux għandhom ikunu użati f'kull livell ta' doża. Il-femminili għandhom ikunu mgħammra ma maskili ta' l-istess speċje u razza, u t-tgħammir ma l-ulied għandu jkun evitat. Għall-annimali gerriema, il-jum 0 tal-gestazzjoni huwa l-jum li fih il-buq vaġinali u/jew l-isperma huma osservati; għall-fniek il-jum 0 huwa normalment il-jum tal-coitus jew ta' l-inseminazzjoni artifiċjali, jekk tkun użata dik it-teknika. In-nisa mgħammra għandhom ikunu aassenjati b'mod mingħajr preġudizju lejn gruppi tal-kontroll u t-trattament. Il-gaġġeġ għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid fil-gaġġeġ ikunu minimizzat. Kull annimal għandu jkun assenjat numru uniku ta' l-identifikazzjoni. In-nisa mgħammra għandhom ikunu assenjati b'manjera mingħajr preġudizzju lejn il-gruppi ta' kontroll u tat-trattament, u jekk in-nisa jkunu mgħammra f'lottijiet, l-annimali ta' kull lott għandhom ikunu imqassma b'mod egwali matul il-gruppi. Bl-istess mod, in-nisa seminati mill-istess raġel għandhom ikunu mqassma b'mod egwali matul il-gruppi.

1.6. PROĊEDURA

1.6.1. **In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Kull grupp tat-test u tal-kontroll għandu jinkludi numru suffiċjenti ta' femminili li jirriżulta f'madwar 20 annimal femmini bis-sita ta' l-implantazzjoni fin-nekropsija. Gruppi ta' anqas minn 16 il-annimal bis-sita ta' l-implantazzjoni jista' ma jkunx xieraq. Il-mortalià materna mhux neċessarjament tinvalida l-istudju, basta li din ma tkunx teċċedi madwar 10 %.

▼B

1.6.2. **Preparazzjoni tad-doża**

Jekk il-mezz jew l-adittiv l-ieħor ikun użat sabiex jiffaċilita d-doża, kunsiderazzjoni għandha tkun mogħtija għal dawn il-karatteristiċi li ġejjin: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu joħolqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ima jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali. Il-mezza la għandu jkun żviluppatament tossiku u l-anqas li jkollu effetti fuq ir-riproduzzjoni.

1.6.3. **Id-Doża**

Normalment, is-sustanza tat-test għandha tkun somministrata ta' kull jum mill-impjantazzjoni (eż. il-jum 5 minn wara t-tgħammir) sal jum ta' qabel is-sezzjoni neċessarju kif skedata. Jekk l-istudji preliminarji, meta disponibbli, ma jkunux jindikaw potenzjal għoli dwar it-telf pre-impjantazzjoni, it-trattament jista' jkun estiż li jinkludi l-perjodu intier tal-ġestjoni, mit-tgħamir sal-jum ta' qabel il-qatla skedata. Huwa ben magħruf li tqandil mhux sewwa jew xi taħbit matul it-tqala jista' jirriżulta f'telf prenatali. Sabiex ikun hemm ħarsien kontra t-telf prenatali minn fatturi li ma humiex relatati mat-trattament, tqandil bla ħtieġa ta' annimali tqal kif ukoll taħbit minn fatturi barranija bħal ma huma l-ħsejjes għandhom ikunu evitati.

Mill-anqas tlett livelli ta' doża u l-kontroll simultanju għandhom ikunu użati. Annimali b'saħħithom għandhom ikunu aassenjati b'mod mingħajr preġudizju lejn gruppi tal-kontroll u t-trattament. Il-livelli tad-doża għandhom ikunu mqassma sabiex jipproduċu l-effetti tossiċi tal-grad tat-tossiċità. Sakemm ma jkunx hemm limitazzjoni tal-propjetajiet tan-natura fiżika/limika jew bioloġika tas-sustanza tat-test, l-għola doża għandha tkun magħżula bil-għan li jkunu introdotti xi tossiċità ta' l-iżvilupp u/jew materna (sinjali kliniċi jew tnaqqis fil-piż tal-ġisem) imma mhux mewt jew sofferenza akuta. Mill-anqas livell ta' doża waħda intermedja għandu jipproduċi effetti tossiċi minimi osservati. Il-livell l-aktyar baxx m'għandux jipproduċi xi evidenza la ta' tossiċità materna u l-anqas ta' l-iżvilupp. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħżulha bil-għan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett ħażin mhu osservat (NOAEL). Tnejn- sa erba intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-doži. Għalkemm l-istebbeliment tal-NOAEL materni huwa l-għan, l-istudji li ma jista'bbilixxux tali livell jistgħu wkoll ikunu aċċettabbli 91).

Livelli ta' doži għandhom ikunu magħżula billi tkun meqjusa xi informazzjoni eżistenti kif ukoll l-informazzjoni addizzjonali dwar il-metaboliżmu u t-tossikukinetiċi tas-sustanza tat-test jew tal-materjali relatati. Din l-infomazzjoni għandha wkoll tgħin fid-dimostrazzjoni ta' l-adekwatezza ta' l-amministrazzjoni tad-dożar.

Grupp ta' kontroll konkorrenti għandu jkun użat. Dan il-grupp għandu jkun grupp ta' kontroll ittrattat taparsi jew mezz ta' grupp ta' kontroll jekk mezz ikun użat fl-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-gruppi kollha għandhom ikunu amministrati l-istess volum jew tas-sustanza tat-test jew tal-mezz. L-annimali fil-grupp(i) tal-kontroll għandhom ikunu mqandla bl-istess manjiera bħal l-annimali fil-grupp tat-test. Il-gruppi bil-mezz ta' kontroll għandhom jirċievu l-mezz fl-għola ammont użat (bħal fil-gruppi ta' l-anqas trattament).

▼B

1.6.4. **Test tal-limitu**

Jekk test f'doża ta' livell wieħed ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum b'amministrazzjoni orali. Li jutilizza l-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma tipproduċi leba tossiċità osservabbli la fl-annimali tqal u l-anqas fil-proġenji tagħhom u jekk effett ma jkunx mistenni kif ibbażat fuq l-informazzjoni eżistenti (eż. minn taħlitiet strutturament u/jew metabilakament relatati), allura studju sħiħ bl-użu ta' doži fi tlett livelli għandu mnejn ikunu ikkonsidrat bħala mhux meħtieġ. L-isposizzjoni umana mistennija tista' tindika il-ħtieġa għal-livell ta' doża orali għola li tkun użata fit-test tal-limitu. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma huwa t-teħid man-nifs jew l-applikazzjoni dermali, il-propjetajiet fiżiku-kimiċi tas-sustanza tat-test ta' spiss jistgħu jindikaw u jillimtaw il-massimu tal-livell attenibbli għall-espożizzjoni (per eżempju, l-applikazzjoni dermali m'għandhiex toħloq tossiċità lokali severa).

1.6.5. **Amministrazzjoni tad-doži**

Is-sustanza tat-test jew il-mezz normalment huwa amministrat bi intubazzjoni orali. Jekk tkun użata rotta oħra ta' l-amministrazzjoni, min jagħmel it-test għandu jipprovdi ġustifikazzjoni u raġjonar għal dik l-għażla, u modifiki xierqa jistgħu li jkunu meħtieġa (2) (3) (4). Is-sustanza tat-test għandha tkun somministrata bejn wieħed u ieħor fl-istess ħin ta' kull jum.

Id-doża lil annimali individwali għandha normalment tkun ibbażata fuq id-determinazzjoni tal-piż tal-ġisem kif l-aktar riċenti disponibbli. B'dana kollu, attenzjoni għandha tkun eżerċitata meta tkun aġġustata d-doża ma tul l-aħħar parti tremestra tat-tqala. Informazzjoni eżistenti għandha tkun użata għall-għażla tad-doża sabiex tipprevjeni eċċess tat-tossiċità materna. B'dana kollu, jekk eċċess ta' tissiċità jkun innutat fin-nisa ittrattati, dawk l-annimali għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk. Jekk diveri annimali tqal juru sinjali ta' tossiċità eċċessiva, kunsiderazzjoni għandha tingħata għat-terminazzjoni ta' dak il-grupp fid-doża. Jekk is-sustanza tkun somministrata b'ikel sfurzat, dan għandu preferibbilment ikun mogħti bħala doża waħda lill-annimali bl-użu ta' tubu lejn l-istinku jew xi canula ta' l-intubazzjoni xierqa. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux jeċċedi 1 ml/100 g piż tal-ġisem, apparti fil-każ ta' taħlitiet akweji meta 2 ml/100 g piż tal-ġisem jista' jkun użat. Meta jkun użat iż-żejt tal-qamħ-ir-rum, il-volum m'għandux jeċċedi 0,4 ml.100 g piż tal-ġisem. Varjabbilità fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-konċentrazzjonijiet sabiex ikun assigurat volum kostanti matul il-livelli kollha tad-doži.

1.6.6. **Osservazzjoni tan-nisa**

Osservazzjonijiet kliniċi għandhom jitwettqu u jkunu rreġistrati mill-anqas darba kull jum, preferibbilment fl-istess ħin(ijiet) billi jkun ikkonsidrat il-perjodu l-aktar probabbli ta' l-effetti antiċipati ta' wara d-doża. Il-kundizzjoni ta' l-annimali għandha tkun irreġistrata, inkluża l-mortalità, l-għaġa tal-mewt, tibdil pertinenti fl-imġieba, u s-sinjali kollha ta' tossiċita barranija.

1.6.7. **Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel**

L-annimali għandhom ikunu miżuna fil-jum 0 tal-ġestazzjoni jew mhux aktar tard mill-jum 3 tal-ġestazzjoni jekk annimali mgħammra skond iż-żmien huma fornuti min fekundament barrani, fl-ewwel jum tad-dpża, mill-anqas kull 3 ijiem matul il-perjodu tad-doża u fil-jum tal-mewt kif skedata.

▼B

Il-konsum ta' l-ikel għandu jkun irreġistrat f'intervalli ta' tlett ijiem u għandu jkun jikkonċidi mal-jiem tad-determinazzjoni tal-piż tal-ġisem.

1.6.8. **Eżaminazzjoni ta' wara l-mewt**

In-nisa għandhom ikunu maqtula jum qabel il-jum mistenni tal-ħlas. Femminili li juri sinjali ta' abort jew ħlas prematur għall-iskeda tal-qatla għandhom ikunu maqtula u suġġetti għal eżaminazzjoni makroskopika bir-reqqa.

Filwaqt tat-terminazzjoni jew tal-mewt matul l-istudju, il-mara tqila għandha tkun eżaminata b'makroskopiki għal xi annormalitajiet strutturali jew tibdilied patoloġiċi. L-evalwazzjoni tan-nisa matul is-sezzjon ċesarja u l-analiżi sussegwenti tal-fetu għandha tkun imwettqa, preferibbilment, mingħajr tagħrif dwar il-grupp tat-trattament, sabiex jitnaqqas il-preġudizzju.

1.6.9. **L-eżami tal-kontenuti uterini**

Immedjetament wara t-terminazzjoni jew malli jkun possibbli wara l-mewt, l-uteri għandhom ikunu mneħħija u l-istat tat-tqala ta' l-annimal aċċertat. L-uteri li jidhru mhux bit-tqala għandhom ikunu aktar eżaminati (eż. bit-tiċpis bis-sulfid ta' l-ammonju għall-annimali gerriema u t-tiċpis Salewski jew b'metodu alternattiv xieraq għall-fniek) sabiex ikun konfermat l-istatus mhux tat-tqala (5).

Uteri tqal jinkludu l-għonq ta' l-uteri għandhom ikunu miżuna. Il-piżijiet ta' l-uteri tqal m'għandhomx ikunu akkwistati minn annimali misjuba mejta waqt l-istudju.

In-numru ta' corpora lutea għandu jkun determinat għall-annimali tqal.

Il-kontenuti ta' l-uteri għandhom ikunu eżaminati għan-numru ta' embrijuni jew imwiet tal-feti jew feti viabbli. Il-grad ta' riassorbazzjoni għandu jkun deskritt sabiex ikun ikkalkolat il-ġin relattiv tal-mewt tal-conceptus (ara s-sezzjoni 1.2).

1.6.10. **L-eżami tal-feti**

Is-sess u l-piż tal-ġisem ta' kull fetu għandhom ikunu determinati.

Kull fetu għandu jkun eżaminat għal tibdiliet esterni (6).

Il-feti għandhom ikunu eżaminati għal tibdiliet skeletali u tal-partijiet rotob (eż. varjazzjonijiet u maformazzjonijiet jew anomaliji) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Kategorizzazzjoni ta' l-alterazzjonijiet tal-feti hija preferibbli imma mhux meħtieġa. Meta ssir il-kategorizzazzjoni, il-kriterja għad-definizzjoni ta' kull kategorija għandha tkun kjarament mistqarra. Attenzjoni partikolari għandha tingħata għall-passaġġ riproduttiv li għandu jkun eżaminat għal sinjali ta' żvilupp mibdul.

Għall-annimali gerriema, madwar nofs kull lott tal-feti għandu jkun ippreparat u eżaminat għal tibdil skeletali. Il-kumplament għandu jkun preparat u eżaminat għal tibdil fil-partijiet rotob, bl-użu ta' metodi aċċettati u xierqa b'sezzjonament serjali jew b'teknina bil-għaqal ta' dissessjoni grossa.

▼B

Għall-annimali mhux gerriema, eż. fniek, il-feti kollha għandhom ikunu eżaminati kemm għall-partijiet rotob u wkoll għal alterazzjonijiet skeletali. L-iġsma ta' dawn il-feti huma evalwati b'dissessjoni galbata għal tibdil fil-partijiet rotob, li jistgħu jinkludu proċeduri għal aktar evalwazzjoni ta' l-istruttura kardijaka interna (25). Ir-rjus ta' nofs il-heti eżaminati b'dan il-mod għandhom ikunu mneħħija u ipproċessati għal evalwazzjoni ta' alterazzjonijiet fil-partijiet rotob (inklużi l-għajnejn, il-moħħ, il-passaġġi nażali u l-ilsien), l-użu ta' metodi normali ta' sezzjonar serjali (26) jew metodu egwalment sensittiv. L-iġsma ta' dawn il-feti u l-kumplament tal-feti intatti għandhom ikunu ipproċessati u eżaminati għal tibdil skeletali, bl-utilizzazzjoni ta' l-istess metodi kif deskritti għall-annimali gerriema.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Id-dettalji għandhom ikunu irrapurati individwalment għan-nisa kif ukoll għall-wild tagħhom u miġbura b'sommarju f'għamla tabulari, li juru għal kull grupp tat-test u għal kull ġenerazzjoni, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew qtil umanitarju, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità kif osservati, inkluż il-ħin ta' meta tkun skoppjat, it-tul ta' żmien, u s-severità ta' xi effetti tossiċi, it-tiġ ta' l-osservazzjonijiet ta' l-embrijuni/feti, u l-informazzjoni l-oħra kollha dwar it-traabi l-oħrajn.

Riżultati numeriċi għandhom ikun evalwati b'metodu statistiku xieraq bl-użu tal-grupp ta' wild bħala unità tad-dettalji għall-analiżi. Metodu statistiku ġeneralment aċċettabbli għandu jkun użat, il-metodi statistiċi għandhom ikunu magħżula bħala parti mid-disinn għall-istudju u għandhom ikunu ġġustifikati. L-informazzjoni mill-annimali li jmutu qabel il-qtil skedat għandha wkol tkun irrapurtata. Dik l-informazzjoni tista' tkun inkluża fil-mezzi tal-grupp meta relevanti. Relevanza mid-dettalji akkwistati minn tali annimali, u għalhekk l-inklużjoni jew l-esklużjoni minn xi mess ta' grupp(i), għandha tkun iġġustifikata u iġġudikata fuq bażi individwali.

2.2. EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Is-sejbiet ta' l-istudju tat-Tossiċità fl-Iżvilupp Prenatali għandhom ikunu evalwati f'termini ta' l-effetti osservati. L-evalwazzjoni għandha tinkludi din l-informazzjoni li ġejja:

— riżultati tat-test materni u tal-embriju/fetu, inkluża l-avalwazzjoni tar-relazzjoni, jew tan-nuqqas tagħha, bejn l-espożizzjoni ta' l-annimali għas-sustanza tat-test u l-inċidenza u s-severità tas-sejbiet kollha;

— ktiterja użata għall-kategorizzazzjoni esterna tal-fetu, il-partijiet rotob, u l-alterazzjonijiet skeletali, jekk il-kategorizzazzjoni tkun seħħet;

▼B

— meta xieraq, id-dettalji stpriċi tal-kontroll sabiex iqawwu l-interpretazzjoni tar-riżultati ta' l-istidju;

— in-numri użati fil-kalkolu tal-persentaġġi kollha jew ta' l-indiċi;

— analiżi statistika adekwata tas-sejbiet ta' l-istudju, meta xieraq, li għandha tinkludi informazzjoni suffiċjenti dwar il-metodu ta' l-analiżi, sabiex riveditur/statistiku independenti jkun jista' jevalwa mill-ġdid jew jerġa jibni l-analiżi.

Fi kwalunkwe studju li juri n-nuqqas ta' xi effetti tossiċi, aktar investigazzjonijiet sabiex tkun stabbilita l-assorbazzjoni u l-biodisponabbiltà tas-sustanza tat-test għandhom ikunu meqjusa.

2.3 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Studju tat-tossiċità fl-iżvilupp prenatali jkun jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' espożizzjoni repetuta lejn sustanza matul it-tqala, fuq in-nisa, u l-iżvilupp intra-utru tal-wild tagħhom. Ir-riżultati ta' l-istudju għandhom ikunu interpretatai b'konnessjoni mas-sejbier mill-istudji subkroniku, riproduttivi, tossikokinetiċi u studji oħrajn. La darba l-enfasi tkun kemm fuq it-tossiċita enerali f'termini ta' tossiċita materna u wkoll fuq it-tossiċità fl-iżvilupp fil-għan finali, ir-riżultati ta' l-istudju jkunu jippermettu sa ċertu limitu għal diskriminazzjoni bejn l-effetti ta' l-iżvilupp li jseħħu fin-nuqqas ta' tossiċità ġenerali u dawk li huma imdaħħla biss f'livelli li huma wkoll tossiċi għall-annimal matern (27).

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni speċifika li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;

— l-identifikazzjoni, inklud in-numru CAS jekk magħruf/stabbilit;

— purità.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

— speċje u t-tipi użati;

— in-numru u l-età ta' l-annimali;

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;

— dettalji dwar is-sustanza tat-test, fomulazzjoni/preparazzjoni tad-dieta, Il-konċentrazzjoni akkwistata, l-istabbilità u l-omoġenità tal-preparazzjoni;

▼B

— dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-konċentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali 9mg/kg il-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— kundizzjonijiet ambjentali;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Riżultati:

Dettalji tar-reazzjoni tossika materna bid-doża, li tinkludi, imma mhux limitata għal-:

— in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li jkunu baqgħu ħajjin, in-numru ta' nisa tqal, u n-numru ta' aborti, in-numru ta' annimali li jweldu kmieni;

— il-jum tal-mewt matul l-istudju jew jekk l-annimali jkunux baqgħu ħajjin sakem maqtula;

— dettalji mill-annimali li ma jkunux baqgħu ħajjin tal-qtil skedat għandu jkun irrapurtat imam mhux inkluż fil-paraguni statis-ticċi inter-grupp;

— il-jum ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal annormali kliniku u l-korsa sussegwenti tiegħu;

— il-piż tal-ġisem, tibdil fil-piż tal-ġisem u l-piż ta' l-utru bil-ħobla, inkluż, b'mod voluntarju, it-tibdil fil-piż tal-ġiesm korreġut għall-piż ta' l-utru bil-ħobla;

— il-konsum ta' l-ikel u, jekk imkejjel, il-konsum ta' l-ilma;

— is-sejbiet tan-nekopsija, inkluż il-piż ta' l-utru;

— NOAEL valuri għall-effetti materni u ta' l-iżvilupp għandhom ikunu irraportati.

L-għanijiet finali ta' l-iżvilupp bid-doża għal grupp ta' frieħ bl-impjanti, inklużi:

— in-numru ta' corpora lutea;

— in-numru ta' implantazzjonijiet, in-numru u l-persentaġġ ta' feti ħajjin u mejta u r- reassorbazzjonijiet;

— in-numru l-persentaġġ ta' telf pre- u post-implantazzjoni.

L-għanijiet finali ta' l-iżvilupp bid-doża għal grupp ta' frieħ b'feti ħajjin, inklużi:

— in-numru u l-persentaġġ ta' frieħ ħajjin;

— relattività tas-sess;

— il-piż tal-ġisem tal-fetu, preferibbilment bis-sess u bis-sessi flimkien;

— alterazzjonijiet esterni, partijiet rotob, u malformazzjoni skele-tali u alterazzjoni relevanti oħrajn;

— kriterja għall-kategorizzazzjoni jekk xierqa;

▼B

— in-numru totali u l-persentaġġ ta' feti u frieħ b'xi alterazzjoni esterna, partijiet rotob jew skeletali, kif ukoll it-tipi u l-inċidenzi ta' anomaliji individwali u alterazzjonijiet oħrajn relevanti.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9;:398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung*. 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.'

▼M4

B.32. STUDJI DWAR IL-KARĊINOĠENIĊITÀ

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 451 (2009) tal-OECD. It-TG 451 oriġinali dwar Studji dwar il-Karċinoġeniċità kienet adottata fl-1981. L-iżvilupp ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32 rivedut tqis li kien meħtieġ biex jirrifletti żviluppi reċenti fil-qasam tat-trattament xieraq tal-annimali u ta' rekwiżiti regolatorji (2) (3) (4) (5) (6). L-aġġornament ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32 twettaq flimkien ma' reviżjonijiet tal-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness: Studji dwar tossiċità kronika, u tal-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness: Studji dwar Tossiċità Kronika Konġunta\Karċinoġeniċità, u bil-għan li jinkiseb tagħrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jingħataw aktar dettalji dwar għażla ta' doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32 huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgħa ta' kimiċi, inklużi pestiċidi u kimiċi industrijali. Għandu jkun innotat iżda li xi dettalji u rekwiżiti jistgħu jkunu differenti għal farmaċewtiċi (ara l-Gwida SIB tal-Konferenza Internazzjonali għall-Armonizzazzjoni (ICH) dwar Ittestjar għall-Karċinoġeniċità ta' Farmaċewtiċi).

2. Il-maġġoranza tal-istudji dwar il-karċinoġeniċità isiru fi speċijiet ta' rodituri, u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, maħsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu meħtieġa fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, il-prinċipji u l-proċeduri li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar flimkien ma' dawk li l-profil tagħhom jinsab fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (6), għandhom ikunu applikati, b'modifiki xierqa. Gwida ulterjuri hija disponibbli fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD dwar it-Tfassil u t-Twettiq ta' Studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (7).

3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar il-Karċinoġeniċità huma orali, dermali u ta' inalazzjoni. L-għażla tar-rotta ta' amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tal-kimika għall-ittestjar u mir-rotta predominanti ta' espożizzjoni umana. Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' rotta ta' espożizzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

4. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiffoka fuq espożizzjoni permezz tar-rotta orali, ir-rotta li komunement l-aktar li tintuża fi studji dwar il-karċinoġeniċità. Filwaqt li studji dwar il-Karċinoġeniċità li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotot dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu meħtieġa għall-valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħħa tal-bniedem u/jew jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji, iż-żewġ rotot ta' espożizzjoni jinvolvu kumplessità teknika konsiderevoli. Studji bħal dawn ikun jeħtiġilhom jitfasslu abbażi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karċinoġeniċità b'amministrazzjoni orali jista' jifforma l-bażi ta' protokoll għal studji dwar inalazzjoni u/jew dermali, fir-rigward ta' rakkomandazzjonijiet għal perjodi ta' trattament, parametri kliniċi u patoloġiċi, eċċ. Hemm gwida tal-OECD dwar l-amministrazzjoni ta' kimiċi għall-ittestjar bir-rotot dermali (7) u tal-inalazzjoni (7) (8). Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9) u l-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (10), flimkien mad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar ittestjar ta' inalazzjoni akuta (8), għandhom ikunu kkonsultati b'mod speċifiku fit-tfassil ta' studji għal tul itwal ta' żmien li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta tal-inalazzjoni. Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (11) għandu jkun ikkonsultat fil-każ ta' ttestjar magħmul bir-rotta dermali.

▼**M4**

5. L-istudju tal-karċinoġeniċità jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għassaħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalgħu minn espożizzjoni ripetuta għal perjodu li jdum tul il-ħajja kollha tal-ispeċi użata. L-istudju għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tossiċi tal-kimika għall-ittestjar, inkluża karċinoġeniċità potenzjali, u jista' jindika organi mmirati u l-possibbiltà ta' akkumulazzjoni. Jista' jipprovdi stima tal-livell bla effett ħażin osservat għal effetti tossiċi u, fil-każ ta' karċinoġeni mhux ġenotossiċi, għal risponsi għal tumuri, li jistgħu jintużaw biex ikunu stabbiliti kriterji ta' sikurezza għal espożizzjoni umana. Qed issir enfażi wkoll dwar il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi sewwa tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.

6. L-għanijiet ta' studji dwar il-karċinoġeniċità koperti minn dan il-Metodu ta' Ttestjar jinkludu:

— L-identifikazzjoni tal-proprjetajiet karċinoġeniċi ta' kimika għall-ittestjar, li tirriżulta f'żieda fl-inċidenza ta' neoplażmi, żieda fil-proporzjon ta' neoplażmi malinni jew tnaqqis fiż-żmien għad-dehra ta' neoplażmi, mqabbel ma' gruppi ta' kontroll konkurrenti,

— L-identifikazzjoni ta' organu/i mmirat(i) ta' karċinoġeniċità;

— L-identifikazzjoni taż-żmien għad-dehra ta' neoplażmi;

— Karatterizzazzjoni tar-relazzjoni bejn it-tumur u r-reazzjoni għad-doża;

— L-identifikazzjoni ta' livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) jew punt ta' tluq biex tkun stabbilita Doża ta' Riferiment (BMD);

— Estrapolazzjoni ta' effetti karċinoġeniċi għal livelli ta' espożizzjoni umana għal doża baxxa;

— Forniment ta' dejta biex ikunu ttestjati ipoteżijiet dwar modalità ta' azzjoni (2) (7) (12) (13) (14) (15).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

7. Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni ta' karċinoġeniċità potenzjali ta' kimika għall-ittestjar, l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju, biex it-tfassil tal-istudju jiffoka fuq l-ittestjar b'aktar effiċjenza għal potenzjal karċinoġeniku u biex l-użu ta' annimali jkun mill-anqas. Informazzjoni dwar, u konsiderazzjoni tal-modalità ta' azzjoni ta' karċinoġenu suspettat (2) (7) (12) (13) (14) (15) hija partikolarment importanti, minħabba li l-aħjar disinn jista' tkun differenti skont jekk il-kimika għall-ittestjar tkunx karċinoġenu ġenotossiku magħruf jew suspettat. Gwida ulterjuri dwar konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

8. Informazzjoni li għandha tassisti fit-tifsila tal-istudju tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; riżultati ta' kull test tat-tossiċità *in vitro* jew *in vivo*, inklużi testijiet ta' ġenotossiċità; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli, mutaġeniċità/ġenotossiċità, karċinoġeniċità u dejta tossikoloġika oħra dwar kimiċi relatati strutturalment; dejta tossikokinetika disponibbli (doża waħda u wkoll kinetika ta' doża ripetuta meta tkun disponibbli) u dejta derivata minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjonijiet. Valutazzjoni tal-karċinoġeniċità għandha ssir wara li tkun inkisbet informazzjoni inizjali dwar tossiċità minn doża ripetuta għal 28 jum u/jew minn

▼M4

testijiet ta' tossiċità għal 90 jum. Testijiet għal żmien qasir ta' bidu-promozzjoni ta' kanċer jistgħu wkoll jipprovdu informazzjoni utli. Approċċ ta' ttestjar f'fażijiet għall- ittestjar tal-karċinoġeniċità għandu jitqies bħala parti mill-valutazzjoni globali tal-effetti potenzjali ħżiena għas-saħħa ta' kimika partikolari għall-ittestjar (16) (17) (18) (19).

9. Il-metodi ta' statistika l-aktar adatti għall-analiżi ta' riżultati, meqjusin it-tifsila u l-għanijiet sperimentali, għandhom ikunu stabbiliti qabel ma jingħata bidu għall-istudju. Kwistjonijiet li għandhom jitqiesu jinkludu jekk l-istatistika għandhiex tinkludi aġġustament għal sopravivenza, analiżi ta' riskji kumulattivi ta' kanċer relattiv għal kemm iddum is-sopravivenza, analiżi taż-żmien għal tumur u analiżi fil-każ ta' tmiem ħesrem ta' grupp wieħed jew aktar. Gwida dwar l-analiżi xierqa ta' statistika u referenzi ewlenin għal metodi ta' statistika aċċettati internazzjonalment jingħataw fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), u wkoll fid-Dokument ta' Gwida Nru 35 dwar l-analiżi u l-evalwazzjoni ta' studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità (20).

10. Fit-tmexxija ta' studju tal-karċinoġeniċità, il-prinċipji u l-konsiderazzjonijiet ta' gwida li l-profil tagħhom jinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 19 tal-OECD dwar l-għarfien, il-valutazzjoni u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem b'mod uman għal annimali għall-esperimenti użati f'evalwazzjoni tas-sikurezza (21), b'mod partikolari l-paragrafu 62 tiegħu, għandhom ikunu segwiti dejjem. Dan il-paragrafuq jiddikjara li "*Fi studji li jinvolvu dożaġġ ripetut, meta annimal juri sinjali kliniċi li huma progressivi, u jwasslu għal iktar deterjorament fil-kundizzjoni, għandha tittieħed deċiżjoni infurmata dwar jekk l-annimal għandux jinqatel b'mod uman jew le. Id-deċiżjoni għandha tinkludi konsiderazzjoni tal-valur tal-informazzjoni li għandha tinkiseb mill-manutenzjoni kontinwata ta' dak l-annimal fl-istudju, relattiv għall-kundizzjoni ġenerali tiegħu. Jekk tittieħed deċiżjoni biex l-annimal jibqa fit-test, il-frekwenza tal-osservazzjonijiet għandha tiżdied, skont il-bżonn. Jista' jkun possibbli wkoll, mingħajr ma jaffettwa b'mod avvers l-iskop tat-test, li d-dożaġġ jieqaf temporanjament jekk dan ħa jtaffi l-uġigħ jew l-iskumdità, jew li tonqos id-doża tat-test.*"

11. Gwida dettaljata u diskussjoni dwar il-prinċipji ta' għażla ta' doża għal studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità tinsab fi Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), kif ukoll f'żewġ pubblikazzjonijiet tal-Internazzjonali Life Sciences Institute (22) (23). L-istrateġija bażika tal-għażla tad-doża tkun tiddependi mill-għan jew għanijiet primarji tal-istudju (il-paragrafu 6). Fl-għażla ta' livelli xierqa ta' doża, għandu jinkiseb bilanċ bejn tgħarbil ta' perikli min naħa waħda u karatterizzazzjoni ta' risponsi għal dożi baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naħa oħra. Dan huwa partikolarment rilevanti fis-sitwazzjoni fejn ikollu jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness) (paragrafu 12).

12. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness) milli eżekuzzjoni separata ta' studju dwar tossiċità kronika (il-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness) u studju tal-karċinoġeniċità (dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32). It-test konġunt jipprovdi aktar effiċjenza fir-rigward ta' ħin u spejjeż imqabblin ma' meta jsiru żewġ studji separati, mingħajr ħsara għall-kwalità tad-dejta fil-fażi kronika jew fil-fażi ta' karċinoġeniċità. Iżda għandhom jitqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 11 u 22-25) meta jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness), u huwa rikonoxxut ukoll li jistgħu jkunu meħtieġa studji separati f'ċerti oqfsa regolatorji.

▼M4

13. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'doži gradwati lil diversi gruppi ta' annimali tat-test għall-parti l-kbira tal-ħajja kollha tagħhom, normalment bir-rotta orali. Ittestjar bl-inalazzjoni jew bir-rotta dermali jista' wkoll ikun adattat. L-annimali jkunu osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità u għall-iżvilupp ta' leżjonijiet neoplastiċi. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimal

15. Dan il-Metodu ta' Ttestjar primarjament ikopri l-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' karċinoġeniċità f'rodituri (paragrafu 2). L-użu ta' speċijiet ta' annimali mhux rodituri jista' jitqies meta dejta disponibbli tissuġġerixxi li jkunu aktar rilevanti għat-tbassir ta' effetti ta' saħħa fil-bnedmin. L-għażla ta' speċi għandha tkun iġġustifikata. L-ispeċi ppreferuta ta' rodituri huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' rodituri, eż. il-ġurdien. Għalkemm l-użu tal-ġurdien f'ittestjar tal-karċinoġeniċità jista' jkollu utilità limitata (24) (25) (26), skont xi programmi regolatorji preżenti l-ittestjar tal-karċinoġeniċità fil-ġurdien għadu meħtieġ sakemm ma jkunx deċiż li studju bħal dan ma jkunx meħtieġ xjentifikament. Firien u ġrieden kienu l-mudelli ppreferuti għall-esperimenti minħabba l-ħajja relattivament qasira tagħhom, l-użu kbir li jsir minnhom fi studji farmakoloġiċi u tossikoloġiċi, is-suxxettibbiltà tagħhom għal induzzjoni ta' tumur u li minnhom hemm razez karatterizzati biżżejjed. Bħala konsegwenza ta' dawn il-karatteristiċi, hemm ammont kbir ta' informazzjoni dwar il-fiżjoloġija u l-patoloġija tagħhom. Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' speċi u razza hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

16. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju tal-karċinoġeniċità għandu preferibbilment isir f'annimali mill-istess razza u sors bħal dawk użati fi studju/i preliminari dwar tossiċità li jdum(u) anqas, għalkemm jekk annimali minn din ir-razza u sors ikunu magħrufa li jippreżentaw problemi biex jinkisbu l-kriterji normalment aċċettati ta' sopravivenza għal studji fit-tul [ara d-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7)], għandha tingħata konsiderazzjoni għall-użu ta' razza ta' annimal li jkollha rata aċċettabbli ta' sopravivenza għall-istudju fit-tul. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal.

Abitazzjoni u għalf

17. L-annimali jistgħu jitqiedu jabitaw individwalment, jew jitqiegħdu f'gaġeġ fi gruppi żgħar tal-istess sess; abitazzjoni għal kull annimal waħdu għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (27) (28) (29). Gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minħabba t-tqegħid ta' gaġeġ. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx 70 % minbarra matul il-ħasil tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. Id-dieta għandha tissodisfa l-ħtiġijiet nutrizzjonali kollha tal-ispeċi ttestjata u l-kontenut ta' kontaminanti tad-dieta, inklużi iżda mhux limitatament għal residwi ta' pestiċidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestroġeni, metalli tqal u mikotossini, li jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultat tat-test, għandu jkun baxx kemm jista' jkun. Informazzjoni

▼M4

analitika dwar il-livelli ta' kontaminanti tan-nutrijent u tad-dieta għandha tkun iġġenerata perjodikament, mill-anqas fil-bidu tal-istudju u meta jkun hemm bidla fil-lott użat, u għandha tkun inkluża fir-rapport finali. Bl-istess mod għandha tkun ipprovduta informazzjoni analitika dwar l-ilma tax-xorb użat fl-istudju. L-għażla ta' dieta tista' tkun influwenzata mill-ħtieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-ħtiġijiet nutrizzjonli tal-annimali meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tar-rotta tad-dieta.

Preparazzjoni tal-annimali

18. Għandhom jintużaw annimali f'saħħithom, li jkunu ġew akklimatizzati għal kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-anqas 7 ijiem li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. Fil-każ ta' rodituri, id-dożaġġ tal-annimali għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara ftim u akklimatazzjoni u preferibbilment qabel mal-annimali jkun għandhom 8 ġimgħat. L-annimali tat-test għandhom ikunu kkaratterizzati fir-rigward ta' speċi, razza, sors, sess, piż u età. Malli jinbeda l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż għal kull sess ta' annimal użat għandha tkun minimali u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju tal-annimali kollha fl-istudju, separatament għal kull sess. L-annimali għandhom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. Wara l-każwalità, m'għandux ikun hemm differenzi sinifikanti fil-piżijiet medji tal-ġisem bejn gruppi f'kull sess. Jekk ikun hemm differenzi sinifikanti ta' statistika, f'dak il-każ il-proċedura ta' każwalità għandha tkun ripetuta, jekk ikun possibbli. Kull annimal għandu jkun assenjat numru ta' identifikazzjoni uniku, u jkun immarkat b'mod permanenti b'dan in-numru b'tatù, b'impjant ta' mikroċipp jew b'metodu ieħor adattat.

PROĊEDURA

Għadd u sess tal-annimali

19. Għandhom jintużaw iż-żewġ sessi. Għandu jintuża għadd suffiċjenti ta' annimali biex evalwazzjoni bijoloġika u ta' statistika bir-reqqa tkun possibbli. Kull grupp ta' doża u grupp ta' kontroll konkurrenti għandhom, għalhekk, ikun fihom mill-anqas 50 annimal taż-żewġ sessi. Skont x'ikun l-għan tal-istudju, jista' jkun possibbli li tiżdied il-qawwa ta' statistika tal-istimi ewlenin billi annimali jkunu allokati b'mod differenzjali u mhux indaqs fil-gruppi varji ta' doża, b'aktar minn 50 annimal fil-gruppi ta' doża baxxa; eż. biex ikun stmat il-potenzjal karċinoġeniku f'doża baxxi. Iżda għandu jkun irrikonoxxut li żieda moderata fid-daqs ta' grupp għandha tipprovdi relattivament ftit żieda fil-qawwa ta' statistika tal-istudju. Aktar informazzjoni dwar tfassil ta' statistika tal-istudju u għażla ta' livelli ta' doża biex jintlaħaq il-massimu tal-qawwa ta' statistika hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

Provvediment għal qatliet interim u gruppi satellitarji (sentinelli)

20. L-istudju jista' jipprovdi għal qatliet interim, eż. fit-12-il xahar, biex jagħti informazzjoni dwar il-progressjoni ta' bidliet neoplastiċi u informazzjoni mekkanistika, jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Fejn diġà jkun hemm informazzjoni bħal din mill-istudji preċedenti ta' tossiċità ta' doża ripetuta dwar il-kimika għall-ittestjar, qatliet interim jistgħu ma jkunux xjentifikament ġustifikati. Jekk qatliet interim ikunu inklużi fit-tifsila tal-istudju, l-għadd ta' annimali f'kull grupp ta' doża skedat għal qatla interim normalment ikun ta' 10 annimali għal kull sess, u l-għadd totali ta' annimali inklużi fit-tifsila tal-istudju għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimali li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Jista' wkoll ikun inkluż grupp addizzjonali ta' annimali sentinelli (tipikament 5 annimali għal kull sess) għall-monitoraġġ tal-istatus ta' mard, jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju (30). Gwida ulterjuri hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

▼M4

Gruppi ta' dożi u dożaġġ

21. Gwida dwar l-aspetti kollha ta' għażla ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Mill-anqas għandhom jintużaw tliet livelli ta' doża u kontroll konkurrenti. Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

22. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex ikunu identifikati l-organi prinċipali u l-effetti tossiċi filwaqt li jkunu evitati tbatija, tossiċità severa, morbidità jew mewt. Filwaqt li jitqiesu l-fatturi li l-profil tagħhom jinsab fil-paragrafu 23 hawn taħt, normalment għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex jislet evidenza ta' tossiċità, kif ikun jidher, pereżempju, minn tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-ġisem (madwar 10 %). Iżda, skont x'ikunu l-għanijiet tal-istudju (ara l-paragrafu 6), tista' *tintgħażel l-ogħla doża anqas mid-doża* li tipprovdi evidenza ta' tossiċità, *eż. jekk doża tislet effett avvers ta' tħassib iżda li madankollu jkollha ftit impatt fuq il-ħajja jew il-piż tal-ġisem.*

23. Jistgħu jintgħażlu livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża biex ikunu stabbiliti doża-rispons u, skont il-modalità ta' azzjoni tal-kimika għall-ittestjar, NOAEL jew riżultat maħsub ieħor tal-istudju, eż. BMD (ara l-paragrafu 25) fil-livell ta' doża l-aktar baxx. Fatturi li għandhom jitqiesu fl-għoti ta' dożi aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-dożi li fihom jistgħu jseħħu bidliet importanti fil-metaboliżmu jew il-modalità ta' azzjoni tossika, fejn ikun mistenni limitu, jew fejn ikun mistenni punt ta' tluq għal estrapolazzjoni ta' doża baxxa.

24. L-ispazjar magħżul ta' livelli ta' doża jkun jiddependi mill-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar, u ma jistax ikun preskritt f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, iżda intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss jipprovdu prestazzjoni tajba ta' test biex ikunu stabbiliti l-livelli minn fuq għal isfel ta' dożi, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' test sikwit hija preferibbli mill-użu ta' intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' madwar 6-10) bejn dożaġġi. B'mod ġenerali, l-użu ta' fatturi akbar minn 10 għandu jkun evitat, u għandu jkun iġġustifikata jekk ikun applikat.

25. Kif diskuss ulterjorment fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), punti li għandhom jitqiesu fl-għażla ta' doża jinkludu:

— Nonlinearitajiet magħrufin jew suspettati jew punti ta' infezzjoni fid-doża-rispons;

— Tossikokinetika u firxa ta' dożi fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn dożi esterni u interni jseħħu jew ma jseħħux;

— Leżjonijiet prekursuri, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;

— Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta' modalità ta' azzjoni, bħal dożi li fihom tibda tfaqqa' ċ-ċitotossiċità, livelli ta' ormoni jitħawdu, mekkaniżmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;

▼M4

— Reġjuni tal-kurva ta’ doża-rispons fejn tkun meħtieġa stima partikolarment robusta, eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;

— Konsiderazzjoni ta’ livelli antiċipati ta’ espożizzjoni umana.

26. Il-grupp ta’ kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta’ kontroll ta’ vejjikoli jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Ħlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta’ kontroll għandhom ikunu maniġġati b’mod identiku bħal dawk fil-gruppi tat-test. Jekk jintuża vejjikolu, il-grupp ta’ kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-ogħla volum użat fost il-gruppi ta’ doża. Jekk kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, u tikkawża li jittieħed anqas ikel tad-dieta b’mod sinifikanti minħabba dieta b’anqas palat, grupp ta’ kontroll addizzjonali ta’ tmigħ lil pari jista’ jkun utli biex iservi ta’ kontroll aktar adattat.

Preparazzjoni ta’ dożi u amministrazzjoni ta’ kimika għall-ittestjar

27. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata oralment, permezz tad-dieta jew ilma tax-xorb, jew b’gavage. Informazzjoni addizzjonali dwar rotot u metodi ta’ amministrazzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (7). Ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni jkunu jiddependi mill-għan tal-istudju, il-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mid-disponibbiltà bijoloġika tagħha u mill-metodu ta’ espożizzjoni umana. Għandu jkun ipprovdut motiv għar-rotta magħżula u għall-metodu ta’ amministrazzjoni. Fl-interess ta’ trattament xieraq tal-annimali, gavage orali għandu normalment jintgħażel biss għal dawk l-aġenti, li għalihom din ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni raġonevolment jirrappreżentaw espożizzjoni potenzjali umana (eż. farmaċewtiċi). Għal kimiċi ta’ dieta jew ambjentali inklużi pestiċidi, l-amministrazzjoni tipikament issir permezz tad-dieta jew b’ilma tax-xorb. Iżda, għal xi xenarji, eż. espożizzjoni okkupazzjonali, amministrazzjoni permezz ta’ rotot oħra tista’ tkun aktar adattata.

28. Meta jkun meħtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinħall jew tiġi sospiża f’vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u addittivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprjetajiet kimiċi tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u effetti fuq l-ikel jew fuq il-konsum tal-ilma jew fuq l-istat nutrizzjonali tal-annimali. Huwa rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jitqies l-użu ta’ soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, u wara titqies soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b’soluzzjoni f’vejjikoli oħra. Għal vejjikoli oħra minbarra ilma, il-karatteristiċi tossiċi tal-vejjikolu għandhom ikunu magħrufa. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar l-istabbiltà tal-kimika għall-ittestjar u l-omoġeneità ta’ soluzzjonijiet ta’ dożaġġ jew dieti (kif jixraq) skont il-kundizzjonijiet ta’ amministrazzjoni (eż. dieta).

29. Għall-kimiċi amministrati permezz tad-dieta jew l-ilma tax-xorb, huwa importanti jkun żgurat li l-kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Fi studji fit-tul dwar tossiċità bl-użu ta’ amministrazzjoni ta’ dieta, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-għalf m’għandhiex tkun aktar ‘il fuq mil-limitu ta’ 5 % tad-dieta totali, biex ikunu evitati żbilanċi nutrizzjonali. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw jew konċentrazzjoni kostanti ta’ dieta (mg/kg dieta jew ppm) jew livell wieħed kostanti ta’ doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgħa. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼M4

30. Fil-każ ta' amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-ġimgħa), normalment għal perjodu ta' 24 xahar għal rodituri (ara wkoll il-paragrafu 32). Kull reġim ieħor ta' dożaġġ, eż. ħamest ijiem fil-ġimgħa, jeħtieġlu jkun iġġustifikat. Fil-każ ta' amministrazzjoni dermali, annimali jkunu normalment ittrattati bil-kimika għall-ittestjar għal mill-anqas 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, kif speċifikat fil-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (11), għal perjodu ta' 24 xahar. Espożizzjoni bir-rotta tal-inalazzjoni ssir għal 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, iżda tista' tintuża wkoll espożizzjoni għal 5 ijiem fil-ġimgħa, jekk dan ikun ġustifikat. Il-perjodu ta' espożizzjoni jkun normalment għal perjodu ta' 24 xahar. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta tintuża espożizzjoni li ddum anqas minn 6 sigħat kuljum. Ara wkoll il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9).

31. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b'gavage lill-annimali, dan għandu jsir billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta' intubazzjoni adattat, f'ħinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża waħda darba kuljum; fejn pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista' jkun possibbli li tinżamm ir-rata ta' doża kuljum billi din tkun amministrata bħala doża maqsuma (darbtejn kuljum). Il-volum massimu ta' likwidu li jkun jista' jiġi amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum għandu jinżamm baxx daqs kemm ikun prattikabbli, u normalment m'għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem għal rodituri (31). Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistgħu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jeħtiġilhom jiġu dilwiti biex ikunu evitati effetti lokali severi. Ittestjar f'konċentrazzjonijiet li x'aktarx ikunu korrużivi jew irritanti għas-sistema gastrointestinali għandu jkun evitat.

Durata tal-istudju

32. Studju normalment idum 24 xahar għal rodituri, li jirrappreżenta l-maġġoranza tal-ħajja kollha normali tal-annimali li għandhom jintużaw. Jistgħu jintużaw studji aqsar jew itwal, skont it-tul tal-ħajja tar-razza tal-ispeċijiet ta' annimali fl-istudju, iżda għandhom ikunu ġġustifikati. Għal razez speċifiċi ta' ġrieden, eż. AKR/J, C3H/J jew C57BL/6J durata ta' 18-il xahar tista' tkun aktar adattata. Dan li ġej jipprovdi xi gwida dwar durata, tmiem tal-istudju u sopravivenza; gwida ulterjuri, inkluża konsiderazzjoni ta' aċċettabbiltà ta' karċinoġeniċità negattiva relattiva għal sopravivenza fl-istudju, hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD dwar it-Tfassil u t-Twettiq ta' Studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (7).

— It-tmiem tal-istudju għandu jitqies meta l-għadd ta' superstiti fil-gruppi ta' doża aktar baxxa jew fil-grupp ta' kontroll jinżel taħt il-25 fil-mija.

— Fil-każ fejn il-grupp ta' doża għolja biss imut ħesrem minħabba tossiċità, dan m'għandux jikkawża t-tmiem tal-istudju.

— Is-sopravivenza ta' kull sess għandha titqies separatament.

— L-istudju m'għandux ikun estiż lil hinn mill-punt meta d-dejta disponibbli mill-istudju ma tkunx aktar suffiċjenti biex tkun tista' ssir evalwazzjoni valida statistikament.

▼**M4**

OSSERVAZZJONIJIET

33. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbidità jew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u fit-tmiem ta' kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. L-annimali għandhom addizzjonalment ikunu eżaminati darba kuljum għal sinjali speċifiċi ta' rilevanza tossikoloġika, filwaqt li jitqies il-perjodu massimu ta' effetti antiċipati wara dożaġġ fil-każ ta' amministrazzjoni b'gavage. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lil żvilupp ta' tumuri; u għandu jiġi rreġistrat iż-żmien meta jfaqqgħu tumuri, post, dimensjonijiet, dehra u progressjoni ta' kull tumur li jkun jidher sewwa u jista' jintmess.

Piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma u effiċjenza fl-ikel

34. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejlijiet ta' konsum ta' ikel u ta' effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata f'ilma tax-xorb. Għandhom jitqiesu wkoll kejlijiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

Ematoloġija, bijokimika klinika u kejlijiet oħra

35. Biex jintlaħaq il-massimu tal-informazzjoni miksuba mill-istudju, speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni, ikunu jistgħu jittieħdu kampjuni tad-demm għal ematoloġija u bijokimika klinika, u dan fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Analiżi tal-awrina jista' wkoll ikun adattat. Gwida ulterjuri dwar il-valur ta' teħid ta' kampjuni bħal dawn bħala parti minn studju tal-karċinoġeniċità hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Jekk jitqies li jkun adattat, teħid ta' kampjuni tad-demm għal determinazzjonijiet ematoloġiċi u ta' kimika klinika u għal analiżi tal-awrina jistgħu jsiru bħala parti minn qatla interim (paragrafu 20) u fi tmiem l-istudju fuq minimu ta' 10 annimali għal kull sess għal kull grupp. Għandhom jittieħdu kampjuni tad-demm minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardijaku jew mis-sinus retroorbitali b'anestesija, u jinħażnu, jekk applikabbli, f'kundizzjonijiet xierqa. Jistgħu wkoll ikunu ppreparati tiċpisiet għal eżami, partikolarment jekk ikun jidher li l-mudullun tal-għadam ikun l-organu mmirat, għalkemm il-valur ta' eżami bħal dan għall-valutazzjoni ta' potenzjal karċinoġeniku/onkoġeniku huwa dubjuż (32).

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

36. L-annimali kollha fl-istudju ħlief annimali sentinelli (ara l-paragrafu 20) u annimali satellitarji oħra għandhom ikunu ssoġġettati għall-awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-feṫiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. L-annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra jista' jkun jeħtiġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Piżijiet ta' organi ma jkunux normalment parti minn studju karċinoġenesi, minħabba li bidliet ġerjatriċi u, fi stadji ta' wara, l-iżvilupp ta' tumuri tħawwad l-utilità ta' dejta dwar piżijiet ta' organi. Huma jistgħu, iżda, ikunu importanti biex jittieħed piż ta' valutazzjoni ta' evidenza u speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni. Jekk ma jkunux parti minn studju satellitarju, huma għandhom jinġabru mhux aktar tard minn sena wara l-bidu tal-istudju.

▼**M4**

37. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (33) (tessuti f'parenteżi kwadri huma fakultattivi):

il-leżjonijiet kbar kollha	qalb	frixa	stonku (il-parti quddimija tal-istonku, stonku glandolari)
glandola adrenali	ileu	glandola tal-paratirojde	[snien]
aorta	jejunum	nerv periferali	testikoli
moħħ (inklużi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/mežoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugħ (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]
glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-ħoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inklużi mnieħer, turbinati u sinus paranażali]	ġilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtoraċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vaġina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-għadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-għadam
Glandola ta' Harder			

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermali ta' amministrazzjoni, il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandhom ikunu ppreservati, u t-teħid ta' kampjuni speċifiċi u l-preservazzjoni tal-ġilda mis-sit ta' applikazzjoni huma essenzjali. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitoli B.8 u B.29 ta' dan l-Anness. Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

▼M4

Istopatoloġija

38. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (33). Il-minimu ta' tessuti eżaminati għandu jkun:

— It-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;

— It-tessuti kollha ta' annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;

— It-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi inklużi tumuri;

— Meta bidliet istopatoloġiċi relatati ma' trattament ikunu osservati fil-grupp ta' doża għolja, dawk l-istess tessuti għandhom ikunu eżaminati mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;

— Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

39. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. Addizzjonalment, id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali fil-bidu tat-test, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kull mewta jew qatla b'mod uman, l-għadd ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż iż-żmien meta jibdew ifaqqgħu, durata u severità ta' kull effett tossiku, l-għadd ta' annimali li juru leżjonijiet, it-tip ta' leżjonijiet u l-perċentwali tal-annimali li juru kull tip ta' leżjoni. Tabelli ta' sommarji ta' dejta għandhom jipprovdu l-mezzi u d-devjazzjonijiet standard (għal dejta ta' test kontinwu) ta' annimali li juru effetti tossiċi jew leżjonijiet, minbarra l-gradazzjoni tal-leżjonijiet.

40. Dejta storika ta' kontroll tista' tkun siewja fl-interpretazzjoni tar-riżultati tal-istudju, eż. fil-każ meta jkun hemm indikazzjonijiet li d-dejta pprovduta mill-kontrolli konkurrenti tkun sostanzjalment diversa meta mqabbla ma' dejta reċenti minn annimali ta' kontroll mill-istess faċilità/kolonja tat-test. Dejta storika ta' kontroll, jekk tkun evalwata, għandha tkun sottomessa mill-istess laboratorju u tkun tirrelata ma' annimali tal-istess età u razza ġġenerati matul il-ħames snin li jkunu ġew qabel l-istudju inkwistjoni.

41. Meta jkunu applikabbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-metodi ta' statistika u d-dejta li jkollha tiġi analizzata għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju (il-paragrafu 9). L-għażla għandha tipprovdi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun meħtieġ.

Rapport tat-test

42. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-Ittestjar:

— natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni;

▼M4

— sors tal-kimika;

— numru tal-lott;

— ċertifikat tal-analiżi tal-kimika;

Vejjikolu (fejn xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

Annimali tat-test:

— speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;

— għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;

— sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;

— piżijiet individwali ta' kull annimal fil-bidu tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test:

— motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;

— meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;

— dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta.

— dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;

— rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieħer jew il-ġisem kollu;

— dożi attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), u fattur ta' konverżjoni minn konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (mg/kg jew ppm) ta' dieta/ilma tax-xorb għad-doża attwali, jekk applikabbli;

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Riżultati (għandhom ikunu ppreżentati sommarju ta' dejta tabulata u dejta dwar annimali individwali):

Ġenerali

— dejta dwar sopravivenza;

— piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— konsum ta' ikel, kalkulazzjonijiet ta' effiċjenza fl-ikel, jekk ikunu saru, u konsum tal-ilma, jekk applikabbli;

— dejta tossikokinetika (jekk disponibbli);

— oftalmoskopija (jekk disponibbli);

— ematoloġija (jekk disponibbli);

— kimika klinika (jekk disponibbli);

▼M4

Sejbiet kliniċi

— Sinjali ta' tossiċità;

— Inċidenza (u, jekk bil-punti, severità) ta' kull anormalità;

— Natura, severità, u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk hux tranżitorji jew permanenti);

Dejta dwar l-awtopsja

— Piż terminali tal-ġisem;

— Piżijiet ta' organi u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli;

— Sejbiet minn awtopsji; inċidenza u severità ta' anormalitajiet;

Istopatoloġija

— Sejbiet istopatoloġiċi mhux neoplastiċi;

— Sejbiet istopatoloġiċi neoplastiċi;

— Korrelazzjoni bejn sejbiet makroskopiċi u mikroskopiċi;

— Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi kollha relatati ma' trattament inklużi gradazzjonijiet ta' severità;

— Rapport ta' kull evalwazzjoni bejn il-pari dwar is-slides;

Trattament ta' statistika ta' riżultati, kif jixraq

Diskussjoni dwar ir-riżultati inklużi

— Diskussjoni dwar kull approċċ ta' mudellar;

— Relazzjonijiet ta' doża-rispons;

— Dejta storika ta' kontroll;

— Qies ta' kull informazzjoni dwar modalità ta' azzjoni;

— Determinazzjoni ta' BMD, NOAEL jew LOAEL

— Rilevanza għall-bnedmin;

Konklużjonijiet

LETTERATURA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

(6) Il-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali dwar Doża Ripetuta għal 90 Jum ta' Test ta' Subtossiċità Kronika Orali f'Annimali Mhux Rodituri.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subakuta Studju ta' 28 Jum.

(10) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subkronika Studju ta' 90 Jum.

(11) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossiċità (Dermali) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittejstjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

B.33. **STUDJI KONĠUNTI DWAR TOSSIĊITÀ KRONIKA/ KARĊINOĠENIĊITÀ**

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 453 (2009) tal-OECD. It-TG 453 oriġinali kienet adottata fl-1981. L-iżvilupp ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.33 aġġornat tqies li kien meħtieġ biex jirrifletti żviluppi reċenti fil-qasam tat-trattament xieraq tal-annimali u ta' rekwiżiti regolatorji (1) (2) (3) (4) (5). L-aġġornament ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.33 twettaq flimkien ma' reviżjonijiet tal-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness: Studji dwar il-Karċinoġeniċità, u tal-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness, studji dwar Tossiċità Kronika, bil-għan li jinkiseb tagħrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jingħataw aktar dettalji dwar għażla ta' doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgħa ta' kimiċi, inklużi pestiċidi u kimiċi industrijali. Għandu jkun innotat iżda li xi dettalji u rekwiżiti jistgħu jkunu differenti għal farmaċewtiċi [ara l-Gwida SIB tal-Konferenza Internazzjonali għall-Armonizzazzjoni (ICH) dwar Ittestjar għall-Karċinoġeniċità ta' Farmaċewtiċi].

2. Il-maġġoranza tal-istudji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità jsiru fi speċijiet ta' rodituri u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, maħsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu meħtieġa fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, il-prinċipji u l-proċeduri li tagħhom jingħata profil jistgħu wkoll ikunu applikati, b'modifiki xierqa, flimkien ma' dawk li l-profil tagħhom jinsab fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (6), skont il-profil tagħhom fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD dwar it-Tfassil u t-Twettiq ta' Studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (7).

3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar tossiċità kronika/karċinoġeniċità huma orali, dermali u ta' inalazzjoni. L-għażla tar-rotta ta' amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tal-kimika għall-ittestjar u mir-rotta predominanti ta' espożizzjoni umana. Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' rotta ta' espożizzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

4. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiffoka fuq espożizzjoni permezz tar-rotta orali, ir-rotta li komunement l-aktar li tintuża fi studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità. Filwaqt li studji fit-tul li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotot dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu meħtieġa għall-valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħħa tal-bniedem u/jew jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji, iż-żewġ rotot ta' espożizzjoni jinvolvu kumplessità teknika konsiderevoli. Studji bħal dawn ikun jeħtiġilhom jitfasslu abbażi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità b'amministrazzjoni orali jista' jifforma l-bażi ta' protokoll għal studji dwar inalazzjoni u/jew dermali, fir-rigward ta' rakkomandazzjonijiet għal perjodi ta' trattament, parametri kliniċi u patoloġiċi, eċċ. Hemm gwida tal-OECD dwar l-amministrazzjoni ta' kimiċi għall-ittestjar bir-rotot tal-inalazzjoni (7) (8) u dermali (7). Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9) u l-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (10), flimkien mad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar ittestjar ta' inalazzjoni akuta (8), għandhom ikunu kkonsultati b'mod speċifiku fit-tfassil ta' studji għal tul itwal ta' żmien li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta tal-inalazzjoni. Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (11) għandu jkun ikkonsultat fil-każ ta' ttestjar magħmul bir-rotta dermali.

▼**M4**

5. L-istudju konġunt tat-tossiċità kronika/karċinoġeniċità jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalgħu minn espożizzjoni ripetuta għal perjodu li jdum tul il-ħajja kollha tal-ispeċi użata. L-istudju għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tossiċi tal-kimika għall-ittestjar, inkluża karċinoġeniċità potenzjali, jindika organi mmirati u l-possibbiltà ta' akkumulazzjoni. Jista' jipprovdi stima tal-livell bla effett ħażin osservat għal effetti tossiċi u, fil-każ ta' karċinoġeni mhux ġenotossiċi, għal risponsi għal tumuri, li jistgħu jintużaw biex ikunu stabbiliti kriterji ta' sikurezza għal espożizzjoni umana. Qed issir enfażi wkoll dwar il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi sewwa tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.

6. L-għanijiet ta' studji dwar tossiċità kronika/karċinoġeniċità koperti minn dan il-Metodu ta' Ttestjar jinkludu:

— L-identifikazzjoni tal-proprjetajiet karċinoġeniċi ta' kimika għall-ittestjar, li tirriżulta f'żieda fl-inċidenza ta' neoplażmi, żieda fil-proporzjon ta' neoplażmi malinni jew tnaqqis fiż-żmien għad-dehra ta' neoplażmi, mqabbel ma' gruppi ta' kontroll konkurrenti,

— Identifikazzjoni taż-żmien għad-dehra ta' neoplażmi;

— Identifikazzjoni tat-tossiċità kronika tal-kimika għall-ittestjar;

— Identifikazzjoni ta' organu/i mmirat(i) ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità,

— Karatterizzazzjoni tar-relazzjoni doża-rispons,

— Identifikazzjoni ta' livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) jew punt ta' tluq biex tkun stabbilita Doża ta' Riferiment (BMD);

— Estrapolazzjoni tal-effetti karċinoġeniċi għal livelli ta' espożizzjoni umana għal doża baxxa,

— Tbassir ta' effetti ta' tossiċità kronika f'livelli ta' espożizzjoni umana,

— Forniment ta' dejta biex ikunu ttestjati ipoteżijiet dwar modalità ta' azzjoni (2) (7) (12) (13) (14) (15).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

7. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karċinoġeniċità potenzjali u tossiċità kronika ta' kimika għall-ittestjar, l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju, biex it-tfassil tal-istudju jiffoka fuq l-ittestjar b'aktar effiċjenza għall-proprjetajiet tossikoloġiċi tagħha u biex l-użu ta' annimali jkun mill-anqas. Informazzjoni dwar, u konsiderazzjoni tal-modalità ta' azzjoni ta' karċinoġenu suspettat (2) (7) (12) (13) (14) (15) hija partikolarment importanti, minħabba li l-aħjar disinn jista' tkun differenti skont jekk il-kimika għall-ittestjar tkunx karċinoġenu ġenotossiku magħruf jew suspettat. Gwida ulterjuri dwar konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

8. Informazzjoni li għandha tassisti fit-tifsila tal-istudju tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; kwalunkwe informazzjoni dwar il-modalità ta' azzjoni; riżultati ta' kull test tat-tossiċità *in vitro* jew *in vivo*, inklużi testijiet ta' ġenotossiċità; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli, mutaġeniċità/ġenotossiċità, karċinoġeniċità u dejta tossikoloġika oħra dwar kimiċi relatati strutturalment; dejta tossikokinetika disponibbli (doża waħda u wkoll kinetika ta' doża ripetuta meta tkun disponibbli) u dejta derivata

▼M4

minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjonijiet. Id-determinazzjoni ta' tossiċità kronika/karċinoġeniċità għandha ssir biss wara li tkun inkisbet informazzjoni inizjali dwar tossiċità minn doża ripetuta għal 28 jum u/jew minn testijiet ta' tossiċità għal 90 jum. Testijiet għal żmien qasir ta' bidu-promozzjoni ta' kanċer jistgħu wkoll jipprovdu informazzjoni utli. Approċċ ta' ttestjar f'fażijiet għall-ittestjar tal-karċinoġeniċità għandu jitqies bħala parti mill-valutazzjoni globali tal-effetti potenzjali ħżiena għas-saħħa ta' kimika partikolari għall-ittestjar (16) (17) (18) (19).

9. Il-metodi ta' statistika l-aktar adatti għall-analiżi ta' riżultati, meqjusin it-tifsila u l-għanijiet sperimentali, għandhom ikunu stabbiliti qabel ma jingħata bidu għall-istudju. Kwistjonijiet li għandhom jitqiesu jinkludu jekk l-istatistika għandhiex tinkludi aġġustament għal sopravivenza, analiżi ta' riskji kumulattivi ta' kanċer relattiv għal kemm iddum is-sopravivenza, analiżi taż-żmien għal tumur u analiżi fil-każ ta' tmiem ħesrem ta' grupp wieħed jew aktar. Gwida dwar l-analiżi xierqa ta' statistika u referenzi ewlenin għal metodi ta' statistika aċċettati internazzjonalment jingħataw fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), u wkoll fid-Dokument ta' Gwida Nru 35 dwar l-analiżi u l-evalwazzjoni ta'studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità (20).

10. Fit-tmexxija ta' studju tal-karċinoġeniċità, il-prinċipji u l-konsiderazzjonijiet ta' gwida li l-profil tagħhom jinsab fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-għarfien, il-valutazzjoni u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem b'mod uman għal annimali għall-esperimenti użati f'evalwazzjoni tas-sikurezza (21), b'mod partikolari l-paragrafu 62 tiegħu, għandhom ikunu segwiti dejjem. Dan il-paragrafuq jiddikjara li "*Fi studji li jinvolvu dożaġġ ripetut, meta annimal juri sinjali kliniċi li huma progressivi, u jwasslu għal iktar deterjorament fil-kundizzjoni, għandha tittieħed deċiżjoni infurmata dwar jekk l-annimal għandux jinqatel b'mod uman jew le. Id-deċiżjoni għandha tinkludi konsiderazzjoni tal-valur tal-informazzjoni li għandha tinkiseb mill-manutenzjoni kontinwata ta' dak l-annimal fl-istudju, relattiv għall-kundizzjoni ġenerali tiegħu. Jekk tittieħed deċiżjoni biex l-annimal jibqa fit-test, il-frekwenza tal-osservazzjonijiet għandha tiżdied, skont il-bżonn. Jista' jkun possibbli wkoll, mingħajr ma jaffettwa b'mod avvers l-iskop tat-test, li d-dożaġġ jieqaf temporanjament jekk dan ħa jtaffi l-uġigħ jew l-iskumdità, jew li tonqos id-doża tat-test.*"

11. Gwida dettaljata u diskussjoni dwar il-prinċipji ta' għażla ta' doża għal studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), kif ukoll f'żewġ pubblikazzjonijiet tal-Internazzjonali Life Sciences Institute (22) (23). L-istrateġija bażika tal-għażla tad-doża tkun tiddependi mill-għan jew għanijiet primarji tal-istudju (il-paragrafu 6). Fl-għażla ta' livelli xierqa ta' doża, għandu jinkiseb bilanċ bejn tgħarbil ta' perikli min naħa waħda u karatterizzazzjoni ta' risponsi għal dożi baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naħa oħra. Dan huwa partikolarment rilevanti fil-każ ta' dan l-istudju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità.

12. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir dan l-istudju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità, milli eżekuzzjoni separata ta' studju dwar tossiċità kronika (il-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness) u studju tal-karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness). It-test konġunt jipprovdi aktar effiċjenza fir-rigward ta' ħin u spejjeż, u xi tnaqqis fl-użu ta' annimali, mqabbel ma' meta jsiru żewġ studji separati, mingħajr ħsara għall-kwalità tad-dejta jew fil-fażi kronika jew fil-fażi ta' karċinoġeniċità. Iżda għandhom jitqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 11 u 22-26) meta jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità, u huwa rikonoxxut ukoll li jistgħu jkunu meħtieġa studji separati f'ċerti oqfsa regolatorji. Gwida ulterjuri dwar it-tifsila tal-istudju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità biex tinkiseb effiċjenza massima tal-istudju fir-rigward ta' possibbiltajiet għal tnaqqis f'għedud ta' annimali użati, kif ukoll permezz ta' sistema komuni għad-diversi proċeduri sperimentali tinsab fi Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

▼M4

13. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. Id-disinn tal-istudju jikkonsisti f'żewġ fażijiet parallelli, fażi kronika u fażi ta' karċinoġeniċità (għad-durata ara l-paragrafi 34 u 35 rispettivament). Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata bir-rotta orali għalkemm l-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni jew dermali jista' wkoll ikun adattat. Għal fażi kronika, il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'doži gradwati lil diversi gruppi ta' annimali tat-test, b'livell ta' doża waħda għal kull grupp, normalment għal perjodu ta' 12-il xahar, għalkemm jistgħu jintgħażlu wkoll perjodi itwal jew aqsar skont rekwiżiti regolatorji (ara l-paragrafu 34). Dan il-perjodu jintgħażel li jkun twil biżżejjed biex kull effett ta' tossiċità kumulattiva jsir jidher, mingħajr l-effetti ta' taħwid ta' bidliet ġerjatriċi. It-tifsila tal-istudju tista' tinkludi wkoll qatla interim waħda jew aktar, eż. fit-tielet jew fis-sitt xahar, u jistgħu jkunu inklużi gruppi addizzjonali ta' annimali biex dan isir (ara l-paragrafu 20). Fil-fażi ta' karċinoġeniċità, il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum lil diversi gruppi ta' annimali tat-test għal porzjon kbir ta' ħajjithom kollha. L-annimali fiż-żewġ fażijiet ikunu osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità u għall-iżvilupp ta' leżjonijiet neoplastiċi. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimali

15. Dan il-Metodu ta' Ttestjar primarjament ikopri l-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità f'rodituri (il-paragrafu 2). L-użu ta' speċijiet ta' annimali mhux rodituri jista' jitqies meta dejta disponibbli tissuġġerixxi li jkunu aktar rilevanti għat-tbassir ta' effetti ta' saħħa fil-bnedmin. L-għażla ta' speċi għandha tkun iġġustifikata. L-ispeċi ppreferuta ta' rodituri huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' rodituri, eż. il-ġurdien. Għalkemm l-użu tal-ġurdien f'ittestjar tal-karċinoġeniċità jista' jkollu utilità limitata (24) (25) (26), skont xi programmi regolatorji preżenti l-ittestjar tal-karċinoġeniċità fil-ġurdien għadu meħtieġ sakemm ma jkunx deċiż li studju bħal dan ma jkunx meħtieġ xjentifikament. Firien u ġrieden kienu l-mudelli ppreferuti għall-esperimenti minħabba l-ħajja relattivament qasira tagħhom, l-użu kbir li jsir minnhom fi studji farmakoloġiċi u tossikoloġiċi, is-suxxettibbiltà tagħhom għal induzzjoni ta' tumur u li minnhom hemm razez karatterizzati biżżejjed. Bħala konsegwenza ta' dawn il-karatteristiċi, hemm ammont kbir ta' informazzjoni dwar il-fiżjoloġija u l-patoloġija tagħhom. It-tfassil u t-twettiq ta' studji dwar tossiċità kronika/karċinoġeniċità fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, meta jkunu meħtieġa, għandhom ikunu bbażati fuq il-prinċipji li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar flimkien ma' dawk fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (6). Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' speċi u razza hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

16. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju konġunt tat-tossiċità kronika/karċinoġeniċità għandu jsir f'annimali mill-istess razza u sors bħal dawk użati fi studju/i preliminari dwar tossiċità li jdum(u) anqas, għalkemm, jekk annimali minn din ir-razza u sors ikunu magħrufa li jippreżentaw problemi biex jinkisbu l-kriterji normalment aċċettati ta' sopravivenza għal studji fit-tul [ara d-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7)], għandu jitqies l-użu ta' razza ta' annimal li jkollha rata aċċettabli ta' sopravivenza għall-istudju fit-tul. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal.

▼M4

Kundizzjonijiet ta' abitazzjoni u għalf

17. L-annimali jistgħu jitqiedu jabitaw individwalment, jew jitqiegħdu f'gaġeġ fi gruppi żgħar tal-istess sess; abitazzjoni għal kull annimal waħdu għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (27) (28) (29). Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minħabba t-tqegħid ta' gaġeġ. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx 70 % minbarra matul il-ħasil tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. Id-dieta għandha tissodisfa l-ħtiġijiet nutrizzjonali kollha tal-ispeċi ttestjata u l-kontenut ta' kontaminanti tad-dieta, inklużi iżda mhux limitatament għal residwi ta' pestiċidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestroġeni, metalli tqal u mikotossini, li jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultat tat-test, għandu jkun baxx kemm jista' jkun. Informazzjoni analitika dwar il-livelli ta' kontaminanti tan-nutrijent u tad-dieta għandha tkun iġġenerata perjodikament, mill-anqas fil-bidu tal-istudju u meta jkun hemm bidla fil-lott użat, u għandha tkun inkluża fir-rapport finali. Bl-istess mod għandha tkun ipprovduta informazzjoni analitika dwar l-ilma tax-xorb użat fl-istudju. L-għażla ta' dieta tista' tkun influwenzata mill-ħtieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-ħtiġijiet nutrizzjonli tal-annimali meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tar-rotta tad-dieta.

Preparazzjoni tal-annimali

18. Għandhom jintużaw annimali f'saħħithom, li jkunu ġew akklimatizzati għal kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-anqas 7 ijiem li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. Fil-każ ta' rodituri, id-dożaġġ tal-annimali għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara ftim u akklimatazzjoni u preferibbilment qabel mal-annimali jkun għandhom 8 ġimgħat. L-annimali tat-test għandhom ikunu kkaratterizzati fir-rigward ta' speċi, razza, sors, sess, piż u età. Malli jinbeda l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż għal kull sess tal-annimali użati għandha tkun minimali u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju tal-annimali kollha fl-istudju, separatament għal kull sess. L-annimali għandhom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. Wara l-każwalità, m'għandux ikun hemm differenzi sinifikanti fil-piżijiet medji tal-ġisem bejn gruppi f'kull sess. Jekk ikun hemm differenzi sinifikanti ta' statistika, f'dak il-każ il-proċedura ta' każwalità għandha tkun ripetuta, jekk ikun possibbli. Kull annimal għandu jkun assenjat numru ta' identifikazzjoni uniku, u jkun immarkat b'mod permanenti b'dan in-numru b'tatù, b'impjant ta' mikroċipp jew b'metodu ieħor adattat.

PROĊEDURA

Għadd u sess tal-annimali

19. Għandhom jintużaw iż-żewġ sessi. Għandu jintuża għadd suffiċjenti ta' annimali biex evalwazzjoni bijoloġika u ta' statistika bir-reqqa tkun possibbli. Għal rodituri, kull grupp ta' doża (skont il-profil tiegħu fil-paragrafu 22) u grupp ta' kontroll konkurrenti maħsub fil-fażi ta' karċinoġeniċità tal-istudju għandhom, għalhekk, ikun fihom mill-anqas 50 annimal taż-żewġ sessi. Skont x'ikun l-għan tal-istudju, jista' jkun possibbli li tiżdied il-qawwa ta' statistika tal-istimi ewlenin billi annimali jkunu allokati b'mod differenzjali u mhux indaqs fil-gruppi varji ta' doża, b'aktar minn 50 annimal fil-gruppi ta' doża baxxa, eż. biex ikun stmat il-potenzjal karċinoġeniku f'doża baxxi. Iżda għandu jkun irrikonoxxut li żieda moderata fid-daqs ta' grupp għandha tipprovdi relattivament ftit żieda fil-qawwa ta' statistika tal-istudju. Kull grupp ta' doża (skont il-profil tiegħu fil-paragrafu 22) u grupp ta' kontroll konkurrenti maħsub għall-fażi ta' tossiċità kronika

▼M4

tal-istudju għandu jkun fihom mill-anqas 10 annimali taż-żewġ sessi, fil-każ ta' rodituri. Għandu jkun innotat li dan l-għadd huwa aktar baxx minn dak fl-studju dwar tossiċità kronika (il-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness). L-interpretazzjoni tad-dejta mill-għadd imnaqqas ta' annimali għal kull grupp fil-fażi ta' tossiċità kronika ta' dan l-istudju konġunt ikun, iżda, sostnut mid-dejta mill-għadd akbar ta' annimali fil-fażi ta' karċinoġeniċità tal-istudju. Fi studji li jinvolvu ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali addizzjonali f'kull grupp ta' doża tal-fażi ta' tossiċità kronika, biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha. Aktar informazzjoni dwar tfassil ta' statistika tal-istudju u għażla ta' livelli ta' doża biex jintlaħaq il-massimu tal-qawwa ta' statistika hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

Provvediment għal qatliet interim, grupp satellitarju u annimali sentinelli

20. L-istudju jista' jipprovdi għal qatliet interim, eż. kull sitt xhur għall-fażi ta' tossiċità kronika, biex jagħti informazzjoni dwar progressjoni ta' bidliet mhux neoplastiċi u informazzjoni mekkanistika, jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Fejn diġà jkun hemm informazzjoni bħal din mill-istudji preċedenti ta' tossiċità ta' doża ripetuta dwar il-kimika għall-ittestjar, qatliet interim jistgħu ma jkunux xjentifikament ġustifikati. L-annimali użati fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju, li normalment iddum 12-il xahar (paragrafu 34), jipprovdu dejta dwar qatla interim fil-fażi ta' karċinoġeniċità tal-istudju, biex b'hekk jinkiseb tnaqqis fl-għadd ta' annimali użati globalment. Gruppi satellitarji jistgħu wkoll ikunu inklużi fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju, biex ikun hemm monitoraġġ tar-riversibbiltà ta' kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata. Dawn jistgħu jkunu ristretti għall-ogħla livell ta' doża tal-istudju flimkien ma' kontroll. Jista' wkoll ikun inkluż grupp addizzjonali ta' annimali sentinelli (tipikament 5 annimali għal kull sess) għall-monitoraġġ tal-istatus ta' mard, jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju (30). Gwida ulterjuri dwar tifsila tal-istudju biex tinkludi qatliet interim, annimali satellitarji u sentinelli, filwaqt li timminimizza l-għadd ta' annimali użati globalment, hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

21. Jekk annimali satellitarji u/jew qatliet interim ikunu inklużi fit-tifsila tal-istudju, l-għadd ta' annimali f'kull grupp ta' doża inklużi għal dan il-fini normalment ikun ta' 10 annimali għaż-żewġ sessi, u l-għadd totali ta' annimali inklużi fit-tifsila tal-istudju għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimalii li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Qatla interim u annimali satellitarji għandhom normalment isirulhom l-istess osservazzjonijiet, inkluż piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma, kejlijiet ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika u investigazzjonijiet patoloġiċi bħall-annimali fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju ewlieni, għalkemm jista' wkoll ikun hemm provvediment (fil-gruppi ta' qtil interim) biex kejlijiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità.

Gruppi ta' dożi u dożaġġ

22. Gwida dwar l-aspetti kollha ta' għażla ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Mill-anqas għandhom jintużaw tliet livelli ta' doża u kontroll konkurrenti, kemm għall-fażi kronika kif ukoll għall-fażi ta' karċinoġeniċità. Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

▼M4

23. Għall-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju, studju sħiħ bl-użu ta' tliet livelli ta' doża jista' ma jitqisx li jkun meħtieġ, jekk ikun jista' jiġi antiċipat li test f'livell ta' doża waħda, ekwivalenti għal mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum, aktarx ma jipproduċix effetti ħżiena. Dan għandu jkun abbażi ta' informazzjoni minn studji preliminari u konsiderazzjoni li tossiċità ma tkunx mistennija, abbażi ta' dejta minn kimiċi relatati strutturalment. Jista' jkun japplika limitu ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum ħlief meta espożizzjoni umana tindika l-ħtieġa li jkollu jintuża livell ogħla ta' doża.

24. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex ikunu identifikati l-organi prinċipali u l-effetti tossiċi filwaqt li jkunu evitati tbatija, tossiċità severa, morbidità jew mewt. Għandu normalment jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex jislet evidenza ta' tossiċità, kif ikun jidher, pereżempju, minn tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-ġisem (madwar 10 %). Iżda, skont x'ikunu l-għanijiet tal-istudju (ara l-paragrafu 6), tista' *tintgħażel l-ogħla doża anqas mid-doża* li tipprovdi evidenza ta' tossiċità, eż. jekk doża tislet effett ħażin ta' tħassib, li madankollu jkollha ftit impatt fuq il-ħajja jew il-piż tal-ġisem.

25. Jistgħu jintgħażlu livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża biex ikunu stabbiliti doża-rispons u, skont il-modalità ta' azzjoni tal-kimika għall-ittestjar, NOAEL jew riżultat maħsub ieħor tal-istudju, eż. BMD (ara l-paragrafu 27). Fatturi li għandhom jitqiesu fl-għoti ta' dożi aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-dożi li fihom jistgħu jseħħu bidliet importanti fil-metaboliżmu jew il-modalità ta' azzjoni tossika, fejn ikun mistenni limitu, jew fejn ikun mistenni punt ta' tluq għal estrapolazzjoni ta' doża baxxa. Fit-tmexxija ta' studju konġunt dwar karċinoġeniċità/tossiċità kronika, l-għan primarju għandu jkun li tinkiseb informazzjoni għal finijiet ta' valutazzjoni tar-riskju minn karċinoġeniċità, u informazzjoni dwar tossiċità kronika tkun normalment għan sussidjarju. Wieħed għandu jiftakar dan meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża għall-istudju.

26. L-ispazjar magħżul ta' livelli ta' doża jkun jiddependi mill-għanijiet tal-istudju u mill-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar, u ma jistax ikun preskritt fid-dettall f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, iżda intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss jipprovdu prestazzjoni tajba ta' test meta jintużaw biex ikunu stabbiliti l-livelli minn fuq għal isfel ta' dożi, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' test sikwit hija preferibbli mill-użu ta' intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' madwar 6-10) bejn dożaġġi. B'mod ġenerali l-użu ta' fatturi akbar minn 10 għandu jkun evitat, u għandu jkun iġġustifikat jekk ikun applikat.

27. Skont il-profil ulterjuri tagħhom li jinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), punti li għandhom jitqiesu fl-għażla ta' doża jinkludu:

— Nonlinearitajiet magħrufin jew suspettati jew punti ta' infezzjoni fid-doża-rispons;

— Tossikokinetika u firxa ta' dożi fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn dożi esterni u interni jseħħu jew ma jseħħux;

— Leżjonijiet prekursuri, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;

▼M4

— Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta’ modalità ta’ azzjoni, bħal dożi li fihom tibda tfaqqa’ ċ-ċitotossiċità, livelli ta’ ormoni jitħawdu, mekkaniżmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;

— Reġjuni tal-kurva ta’ doża-rispons fejn tkun meħtieġa stima partikolarment robusta, eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;

— Konsiderazzjonita’ livelli antiċipati ta’ espożizzjoni umana, speċjalmentfl-għażla ta’ dożi medji u baxxi.

28. Il-grupp ta’ kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta’ kontroll ta’ vejjikoli jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Ħlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta’ kontroll għandhom ikunu maniġġati b’mod identiku bħal dawk fil-gruppi tat-test. Jekk jintuża vejjikolu, il-grupp ta’ kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-ogħla volum użat fost il-gruppi ta’ doża. Jekk kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, u tikkawża li jittieħed anqas ikel tad-dieta b’mod sinifikanti minħabba dieta b’anqas palat, grupp ta’ kontroll addizzjonali ta’ tmigħ lil pari jista’ jkun utli biex iservi ta’ kontroll aktar adattat.

Preparazzjoni ta’ dożi u amministrazzjoni ta’ kimika għall-ittestjar

29. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata oralment, permezz tad-dieta jew ilma tax-xorb, jew b’gavage. Informazzjoni addizzjonali dwar rotot u metodi ta’ amministrazzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (7). Ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-għan tal-istudju, mill-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mid-disponibbiltà bijoloġika tagħha, u mir-rotta predominanti u mill-metodu ta’ espożizzjoni umana. Għandu jkun ipprovdut motiv għar-rotta magħżula u għall-metodu ta’ amministrazzjoni. Fl-interessi ta’ trattament xieraq tal-annimali, gavage orali għandu normalment jintgħażel biss għal dawk l-aġenti li għalihom din ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni raġonevolment jirrappreżentaw espożizzjoni potenzjali umana (eż. farmaċewtiċi). Għal kimiċi ta’ dieta jew ambjentali inklużi pestiċidi, l-amministrazzjoni tipikament issir permezz tad-dieta jew b’ilma tax-xorb. Iżda, għal xi xenarji, eż. espożizzjoni okkupazzjonali, amministrazzjoni permezz ta’ rotot oħra tista’ tkun aktar adattata.

30. Meta jkun meħtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinħall jew tiġi sospiża f’vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u additivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprjetajiet kimiċi tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u effetti fuq l-ikel jew fuq il-konsum tal-ilma jew fuq l-istat nutrizzjonali tal-annimali. Huwa rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jitqies l-użu ta’ soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, segwit minn konsiderazzjoni ta’ soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b’soluzzjoni f’vejjikoli oħra. Għal vejjikoli oħra minbarra ilma, il-karatteristiċi tossiċi tal-vejjikolu għandhom ikunu magħrufa. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar l-istabbiltà tal-kimika għall-ittestjar u l-omoġeneità ta’ soluzzjonijiet ta’ dożaġġ jew dieti (kif jixraq) skont il-kundizzjonijiet ta’ amministrazzjoni (eż. dieta).

31. Għall-kimiċi amministrati permezz tad-dieta jew l-ilma tax-xorb, huwa importanti jkun żgurat li l-kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Fi studji fit-tul dwar tossiċità bl-użu ta’ amministrazzjoni ta’ dieta, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-għalf m’għandhiex tkun aktar ‘il fuq mil-limitu ta’ 5 % tad-dieta totali, biex ikunu evitati żbilanċi nutrizzjonali. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw jew konċentrazzjoni kostanti ta’ dieta (mg/kg dieta jew ppm), jew livell wieħed kostanti ta’ doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgħa. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼M4

32. Fil-każ ta’ amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-ġimgħa) għal perjodu ta’ 12-il xahar (fażi kronika) jew 24 xahar (fażi ta’ karċinoġeniċità), ara wkoll il-paragrafi 33 u 34. Kwalunkwe reġim ieħor ta’ dożaġġ, eż. ħamest ijiem fil-ġimgħa, jeħtieġlu jkun iġġustifikat.. Fil-każ ta’ amministrazzjoni dermali, annimali jkunu normalment ittrattati bil-kimika għall-ittestjar għal mill-anqas 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, kif speċifikat fil-Kapitolu B.9 ta’ dan l-Anness (11), għal perjodu ta’ 12-il xahar (fażi kronika) jew 24 xahar (fażi ta’ karċinoġeniċità). Espożizzjoni bir-rotta tal-inalazzjoni ssir għal 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, iżda tista’ tintuża wkoll espożizzjoni għal 5 ijiem fil-ġimgħa, jekk dan ikun ġustifikat. Il-perjodu ta’ espożizzjoni jkun normalment għal perjodu ta’ 12-il xahar (fażi kronika) jew 24 xahar (fażi ta’ karċinoġeniċità). Jekk speċijiet ta’ rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta’ espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta tintuża espożizzjoni li ddum anqas minn 6 sigħat kuljum. Ara wkoll il-Kapitolu B.8 ta’ dan l-Anness (9).

33. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b’gavage lill-annimali dan għandu jsir billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta’ intubazzjoni adattat, f’ħinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża waħda darba kuljum, meta pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista’ jkun possibbli li tinżamm ir-rata ta’ doża kuljum billi din tkun amministrata bħala doża maqsuma (darbtejn kuljum). Il-volum massimu ta’ likwidu li jkun jista’ jiġi amministrat f’waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum għandu jinżamm baxx daqs kemm ikun prattikabbli, u normalment m’għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem għal rodituri (31). Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistgħu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jeħtiġilhom jiġu dilwiti biex ikunu evitati effetti lokali severi. Ittestjar f’konċentrazzjonijiet li x’aktarx ikunu korrużivi jew irritanti għas-sistema gastrointestinali għandu jkun evitat.

Durata tal-istudju

34. Il-perjodu ta’ dożaġġ u durata tal-fażi kronika ta’ dan l-istudju jkunu normalment ta’ 12-il xahar, għalkemm it-tifsila tal-istudju tippermetti wkoll u tista’ tkun applikata għal studji li jdumu anqas (eż. 6 jew 9 xhur) jew aktar (eż. 18 jew 24 xhur), skont ir-rekwiżiti ta’ reġimi regolatorji partikolari jew għal għanijiet mekkanistiċi speċifiċi. Devjazzjonijiet minn espożizzjoni li ddum 12-il xahar għandhom ikunu ġġustifikati, l-aktar fil-każ ta’ dawk li jdumu anqas. Il-gruppi kollha ta’ doża allokati lil din il-fażi għandhom jintemmu fiż-żmien indikat għal evalwazzjoni ta’ tossiċità kronika u għal patoloġija mhux neoplastika. Gruppi satellitarji inklużi għall-monitoraġġ tar-riversibbiltà ta’ kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata għandhom jinżammu mingħajr dożaġġ għal perjodu ta’ mhux anqas minn 4 ġimgħat u ta’ mhux aktar minn terz ta’ kemm idum l-istudju totali wara li tkun intemmet espożizzjoni.

35. Id-durata tal-fażi ta’ karċinoġeniċità ta’ dan l-istudju tkun normalment ta’ 24 xahar għal rodituri, li jirrappreżenta l-maġġoranza tal-ħajja kollha normali tal-annimali li għandhom jintużaw. Jistgħu jintużaw studji aqsar jew itwal, skont it-tul tal-ħajja tar-razza tal-ispeċijiet ta’ annimali fl-istudju, iżda għandhom ikunu ġġustifikati. Għal razez speċifiċi ta’ ġrieden, eż. AKR/J, C3H/J jew C57BL/6J durata ta’ 18-il xahar tista’ tkun aktar adattata. Dan li ġej jipprovdi xi gwida dwar durata, tmiem tal-istudju u sopravivenza; gwida ulterjuri, inkluża konsiderazzjoni tal-aċċettabbiltà ta’ studju ta’ karċinoġeniċità negattiva relattiva għal sopravivenza fl-istudju, hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (7):

▼M4

— It-tmiem tal-istudju għandu jitqies meta l-għadd ta' superstiti fil-gruppi ta' doża aktar baxxa jew fil-grupp ta' kontroll jinżel taħt il-25 fil-mija.

— Fil-każ fejn il-grupp ta' doża għolja biss imut ħesrem minħabba tossiċità, dan m'għandux jikkawża t-tmiem tal-istudju.

— Is-sopravivenza ta' kull sess għandha titqies separatament.

— L-istudju m'għandux ikun estiż lil hinn mill-punt meta d-dejta disponibbli mill-istudju ma tkunx aktar suffiċjenti biex tkun tista' ssir evalwazzjoni valida statistikament.

OSSERVAZZJONIJIET (FAŻI TA' TOSSIĊITÀ KRONIKA)

36. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbidità jew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u t-tmiem ta' kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. Osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-anqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin(ijiet) kull jum, filwaqt li jitqies il-perjodu massimu ta' effetti antiċipati wara dożaġġ fil-każ ta' amministrazzjoni b'gavage.

37. Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru fuq l-annimali kollha mill-anqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (biex jitħallew isiru paraguni skont is-suġġett), fi tmiem l-ewwel ġimgħa tal-istudju u kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-protokoll għal osservazzjonijiet għandu jkun magħmul b'mod li varjazzjonijiet bejn osservaturi individwali jkunu mminimizzati u indipendenti minn grupp ta' test. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra mill-gaġġa ta' abitazzjoni, preferibbilment f'arena standard u f'ħinijiet simili għal kull jum f'kull okkażjoni. Huma għandhom ikunu rreġistrati sewwa, preferibbilment billi jintużaw sistemi ta' punti, iddefiniti espliċitament mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandhom isiru sforzi biex ikun żgurat li varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' osservazzjoni jkunu minimi. Sinjali nnotati għandhom jinkludi, iżda ma jkunux limitati għal, bidliet fil-ġilda, pil, għajnejn, membrani mukuża, okkorrenza ta' sekrezzjonijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż. tidmigħ, erezzjoni tal-pil, daqs tal-pupilli, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Bidliet fil-mixja, qagħda u rispons għal immaniġġar, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv) jew imġiba bižarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (32).

38. Eżami oftalmoloġiku, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir ieħor adattat, għandu jsir fuq l-annimali kollha qabel l-ewwel amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Fit-tmiem tal-istudju, dan l-eżami għandu preferibbilment isir għall-annimali kollha iżda mill-anqas fid-doża għolja u fil-gruppi ta' kontroll. Jekk fl-għajnejn jinstabu bidliet relatati ma' trattament, l-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati. Jekk analiżi strutturali jew informazzjoni oħra jissuġġerixxu tossiċità okulari, f'dak il-każ il-frekwenza ta' eżami okulari għandha tiżdied.

39. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta' tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti newrotossiċi, reattività sensorja għal stimuli ta' tipi differenti (32) (eż. stimuli tas-smigħ, viżivi u proprjoċettivi) (33) (34) (35), ikunu jistgħu jsiru b'mod fakultattiv valutazzjoni tal-qawwa ta' qbid (36) u valutazzjoni tal-attività motorja (37) qabel il-bidu tal-istudju u f'perjodi ta' 3 xhur wara li jkun beda l-istudju sa u inklużi 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar). Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi.

▼M4

40. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta' tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti immunotossiċi, investigazzjonijiet ulterjuri ta' dan il-punt ta' tmiem ikunu jistgħu jsiru b'mod fakultattiv fit-tmiem.

Piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma u effiċjenza fl-ikel

41. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejlijiet ta' konsum ta' ikel u ta' effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata f'ilma tax-xorb. Għandhom jitqies wkoll kejlijiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

Ematoloġija u bijokimika klinika

42. Fi studji li jinvolvu rodituri, għandhom isiru eżamijiet ematoloġiċi fuq l-annimali kollha tal-istudju (10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp) kull 3, 6, u 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar). Għal ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha (ara l-paragrafu 19). Fi studji ta' annimali mhux rodituri, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'ħinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal rodituri. Il-kejlijiet kull 3 xhur, għal rodituri jew għal annimali mhux rodituri, jistgħu ma jsirux jekk ma jkunu dehru ebda effetti fuq parametri ematoloġiċi fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Għandhom jittieħdu kampjuni tad-demm minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardijaku jew minn sinus retroorbitali, b'anestesija.

43. Il-lista ta' parametri li ġejja għandha tkun investigata (38): Għadd total u differenzjali ta' lewkoċiti, għadd ta' eritroċiti, għadd ta' pjastrini, konċentrazzjoni ta' emoglobina, ematokrit (volum ta' ċelluli ppakkjati), volum korpuskulari medju (MCV), emoglobina korpuskulari medja (MCH), konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja (MCHC), ħin protrombin u ħin tromboplastin parzjali attivat. Parametri ematoloġiċi oħra bħal korpi ta' Heinz jew morfoloġija atipika oħra ta' eritroċiti jew metemoglobina jistgħu jitkejlu kif jixraq skont it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, għandu jkun adottat approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar. Jekk il-kimika għall-ittestjar ikollha effett fuq is-sistema ematopojetika, jistgħu jkunu indikati wkoll għedud ta' retikoloċiti u ċitoloġija tal-mudullun tal-għadam, għalkemm dawn għandhom isiru b'rutina.

44. Determinazzjonijiet ta' bijokimika għall-investigazzjoni ta' effetti tossiċi maġġuri f'tessuti u, speċifikatament, ta' effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demm miksubin mill-annimali kollha tal-istudju (10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp), fl-istess intervalli ta' ħin kif speċifikat għall-investigazzjonijiet ematoloġiċi. Għal ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika kollha meħtieġa. Fi studji ta' annimali mhux rodituri, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'ħinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal rodituri. Jistgħu ma jsirux kejlijiet

▼M4

kull 3 xhur għal rodituri jew għal annimali mhux rodituri jekk ma jkun deher ebda effett fuq parametri ta' bijokimika klinika fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Huwa rrakkomandat sawm tul il-lejl għall-annimali (bl-eċċezzjoni tal-ġrieden) qabel ma jittieħdu kampjuni tad-demm ([1]). Il-lista ta' parametri li ġejja għandha tkun investigata (38): glukożju, urea (nitroġenu tal-urea), kreatinina, proteina totali, albumina, kalċju, sodju, potassju, kolesterol totali, mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatoċellulari (aminotransferaži tal-alanina, aspartate aminotransferaži, glutamat ta' deidroġenaži, aċidi totali tal-bili) (39), u mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatobiljari (fosfataži alkalina, gamma glutamil trasferimentaži, 5'-nukleotidaži, bilirubina totali, aċidi totali tal-bili) (39). Parametri oħra ta' bijokimika klinika bħal trigliċeridi sajmin, ormoni speċifiċi u kolinesteraži jistgħu jitkejlu kif jixraq, skont it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, hemm ħtieġa ta' approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar.

45. Determinazzjonijiet ta' analiżi tal-awrina għandhom isiru fuq l-annimali kollha tal-istudju (10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp), fuq kampjuni miġburin fl-istess intervalli bħal dawk għall-ematoloġija u l-kimika klinika. Ma jkunx meħtieġ isiru kejlijiet kull 3 xhur jekk ma jkun deher ebda effett fuq analiżi tal-awrina fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Il-lista ta' parametri li ġejja kienet inkluża f'rakkomandazzjoni esperta dwar studji ta' patoloġija klinika (38): dehra, volum, ożmolalità jew gravità speċifika, pH, proteina totali u glukożju. Determinazzjonijiet oħra jinkludu keton, urobilinoġenu, bilirubina u demm moħbi. Jistgħu jintużaw aktar parametri meta jkun meħtieġ biex tkun estiża l-investigazzjoni ta' effett(i) osservat(i).

46. Huwa meqjus b'mod ġenerali li jeħtieġu jkunu ddeterminati varjabbli bażi ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel trattament għal studji dwar il-klieb, iżda ma jeħtiġilhomx ikunu ddeterminati fi studji dwar rodituri (38). Iżda, jekk dejta bażi storika (ara l-paragrafu 58) ma tkunx adegwata, għandu jitqies li tkun iġġenerata dejta bħal din.

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

47. L-annimali kollha fl-istudju għandhom normalment ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Iżda jista' wkoll ikun hemm provvediment (fil-qatla interim jew fi gruppi satellitarji) biex kejlijiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità (ara l-paragrafu 21). Dawn l-annimali jistgħu ma jkunux soġġetti għal awtopsja u għall-proċeduri sussegwenti deskritti fil-paragrafi li ġejjin. L-annimali sentinelli jista' jkun jeħtiġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju.

([1]) Għal għadd ta' kejlijiet ta' serum u plażma, notevolment l-aktar għall-glukożju, sawm matul il-lejl huwa ppreferut. Ir-raġuni ewlenija għal din il-preferenza hija li aktar varjabbiltà li għandha inevitabbilment tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, tittendi li taħbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċili. Iżda għandu jkun innotat li sawn tul il-lejl jista' joħloq interferenza fil-metaboliżmu ġenerali tal-annimali u, b'mod partikolari fi studji dwar għoti ta' ikel, jista' jiddisturba l-espożizzjoni ta' kull jum għall-kimika għall-ittestjar. L-annimali kollha għandhom ikunu vvalutati fl-istess kondizzjoni fiżjoloġika, u valutazzjonijiet dettaljati jew newroloġiċi għandhom preferibbilment ikunu, għalhekk, skedati għal jum differenti milli għal teħid ta' kampjuni ta' bijokimika klinika.

▼**M4**

48. Piżijiet ta' organi għandhom jinġabru mill-annimali kollha, minbarra dawk eskluži bil-parti tal-aħħar tal-paragrafu 47. L-adrenali, il-moħħ, l-epididimi, il-qalb, il-kliewi, il-fwied, l-ovarji, il-milsa, it-testikoli, it-tirojde (jintiżnu wara fissazzjoni, ma' paratirojdi), u l-utru tal-annimali kollha (minbarra ta' dawk misjubin qed imutu u/jew qed jinqatlu fil-frattemp) għandhom jintraqmu minn kull tessut imwaħħal magħhom, kif jixraq, u l-piż tagħhom fl-imxarrab għandu jittieħed malajr kemm jista' jkun wara dissezzjoni biex ma jitħalliex ikun hemm inxif.

49. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (40) (tessuti f'parenteži kwadri huma fakultattivi):

il-leżjonijiet kbar kollha	qalb	frixa	stonku (il-parti quddimija tal-istonku, stonku glandolari)
glandola adrenali	ileu	glandola tal-paratirojde	[snien]
aorta	jejunum	nerv periferali	testikoli
moħħ (inkluži taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/mežoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugħ (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]
glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-ħoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inkluži mnieħer, turbinati u sinus paranażali]	ġilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtoraċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vaġina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-għadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-għadam
Glandola ta' Harder			

▼M4

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermali ta' amministrazzjoni, il-lista ta'organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata, u jkunu meħtieġa teħid ta' kampjuni speċifiċi u preservazzjoni tal-ġilda mis-sit ta' applikazzjoni. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9) u tal-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (10). Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

Istopatoloġija

50. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (40). L-eżamijiet istopatoloġiċi minimi għandhom ikunu:

— it-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;

— it-tessuti kollha minn annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;

— it-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi;

— it-tessuti mmirati jew tessuti li wrew bidliet relatati ma' trattament fil-grupp ta' doża għolja, mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;

— fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu eżaminati.

OSSERVAZZJONIJIET (FAŻI TA' KARĊINOĠENIĊITÀ)

51. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbidità jew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u fit-tmiem ta' kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. L-annimali għandhom addizzjonalment ikunu eżaminati darba kuljum għal sinjali speċifiċi ta' rilevanza tossikoloġika. Fil-każ ta' studji dwar gavage, annimali għandhom ikunu eżaminati fil-perjodu li jiġi minnufih wara dożaġġ. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lil żvilupp ta' tumuri; u għandu jiġi rreġistrat iż-żmien meta jfaqqgħu tumuri, post, dimensjonijiet, dehra u progressjoni ta' kull tumur li jkun jidher sewwa u jista' jintmess.

52. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejlijiet ta' konsum ta' ikel u ta' effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata f'ilma tax-xorb. Għandhom jitqies wkoll kejlijiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

▼**M4**

Ematoloġija, bijokimika klinika u kejlijiet oħra

53. Biex jintlaħaq il-massimu tal-informazzjoni miksuba mill-istudju, speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni, ikunu jistgħu jittieħdu kampjuni tad-demm għal ematoloġija u bijokimika klinika, għalkemm dan ikun fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. L-analiżi tal-awrina tista' wkoll ikun adattata. Dejta dwar l-annimali użati fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju, li normalment iddum 12-il xahar (il-paragrafu 34) għandha tipprovdi informazzjoni dwar dawn il-parametri. Gwida ulterjuri dwar il-valur ta' teħid ta' kampjuni bħal dawn bħala parti minn studju tal-karċinoġeniċità hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Jekk jittieħdu kampjuni tad-demm, dawn għandhom jinġabru fit-tmiem tal-perjodu tat-test, eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-qtil tal-annimali. Huma għandhom jittieħed minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardijaku jew mis-sinus retroorbitali, b'anestesija. Jistgħu wkoll ikunu ppreparati tiċpisiet għal eżami, partikolarment jekk ikun jidher li l-mudullun tal-għadam ikun l-organu mmirat, għalkemm il-valur ta' eżami bħal dan ta' tiċpisiet tad-demm fil-fażi ta' karċinoġeniċità għall-valutazzjoni ta' potenzjal karċinoġeniku/onkoġeniku huwa dubjuż (38).

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

54. L-annimali kollha fl-istudju ħlief annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra (ara l-paragrafu 20) għandhom ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. L-annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra jista' jkun jeħtiġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Piżijiet ta' organi ma jkunux normalment parti minn studju karċinoġenesi, minħabba li bidliet ġerjatriċi u, fi stadji ta' wara, l-iżvilupp ta' tumuri tħawwad l-utilità ta' dejta dwar piżijiet ta' organi. Huma jistgħu, iżda, ikunu importanti biex jittieħed piż ta' valutazzjoni ta' evidenza u speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni. Jekk ma jkunux parti minn studju satellitarju, huma għandhom jinġabru mhux aktar tard minn sena wara l-bidu tal-istudju.

55. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (40) (tessuti f'parenteżi kwadri huma fakultattivi):

il-leżjonijiet kbar kollha	qalb	frixa	stonku (il-parti quddimija tal-istonku, stonku glandolari)
glandola adrenali	ileu	glandola tal-paratirojde	[snien]
aorta	jejunum	nerv periferali	testikoli
moħħ (inklużi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/mežoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugħ (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]
glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-ħoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina

▼M4

duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inklużi mnieħer, turbinati u sinus paranażali]	ġilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtora-ċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vaġina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-għadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-għadam
Glandola ta' Harder			

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermali ta' amministrazzjoni, il-lista ta'organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata, u jkunu meħtieġa teħid ta' kampjuni speċifiċi u preservazzjoni tal-ġilda mis-sit ta' applikazzjoni. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (8) u tal-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (9). Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

Istopatoloġija

56. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (40). Il-minimu ta' tessuti eżaminati għandu jkun:

— It-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;

— It-tessuti kollha ta' annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;

— It-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi inklużi tumuri;

— Meta bidliet istopatoloġiċi relatati ma' trattament ikunu osservati fil-grupp ta' doża għolja, dawk l-istess tessuti għandhom ikunu eżaminati mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;

— Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati.

▼**M4**

DEJTA U RAPPURTAR (KARĊINOĠENIĊITÀ U TOSSIĊITÀ KRONIKA)

Dejta

57. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. Addizzjonalment, id-dejta kollha għandha tingħabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali fil-bidu tat-test, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kull mewta jew qatla b'mod uman, l-għadd ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż iż-żmien meta jibdew ifaqqgħu, durata u severità ta' kull effett tossiku, l-għadd ta' annimali li juru leżjonijiet, it-tip ta' leżjonijiet u l-perċentwali tal-annimali li juru kull tip ta' leżjoni. Tabelli ta' sommarji ta' dejta għandhom jipprovdu l-mezzi u d-devjazzjonijiet standard (għal dejta ta' test kontinwu) ta' annimali li juru effetti tossiċi jew leżjonijiet, minbarra l-gradazzjoni tal-leżjonijiet.

58. Dejta storika ta' kontroll tista' tkun siewja fl-interpretazzjoni tar-riżultati tal-istudju, eż., fil-każ meta jkun hemm indikazzjonijiet li d-dejta pprovduta mill-kontrolli konkurrenti tkun sostanzjalment diversa meta mqabbla ma' dejta reċenti minn annimali ta' kontroll mill-istess faċilità/kolonja tat-test. Dejta storika ta' kontroll, jekk tkun evalwata, għandha tkun sottomessa mill-istess laboratorju, tkun tirrelata ma' annimali tal-istess età u razza u ġġenerata matul il-ħames snin li jkunu ġew qabel l-istudju inkwistjoni.

59. Meta jkunu applikabbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-metodi ta' statistika u d-dejta li jkollha tiġi analizzata għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju (il-paragrafu 9). L-għażla għandha tipprovdi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun meħtieġ.

60. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

— natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni;

— sors tal-kimika;

— numru tal-lott;

— ċertifikat tal-analiżi tal-kimika.

Vejjikolu (fejn xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma).

Annimali tat-test:

— speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;

— għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;

— sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;

— piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

▼M4

Kundizzjonijiet tat-test:

— motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;

— meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;

— dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta;

— dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;

— rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieħer jew il-ġisem kollu;

— dożi attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), u fattur ta' konverżjoni minn konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (mg/kg jew ppm) ta' dieta/ilma tax-xorb għad-doża attwali, jekk applikabbli;

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Riżultati (għandhom ikunu ppreżentati sommarji tad-dejta tabulata u dejta dwar annimali individwali):

Ġenerali

— Dejta dwar sopravivenza;

— Piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— Konsum ta' ikel, kalkulazzjonijiet ta' effiċjenza fl-ikel, jekk ikunu saru, u konsum tal-ilma jekk applikabbli;

— Dejta tossikokinetika jekk disponibbli;

— Oftalmoskopija (jekk disponibbli)

— Ematoloġija (jekk disponibbli)

— Kimika klinika (jekk disponibbli)

Sejbiet kliniċi

— Sinjali ta' tossiċità;

— Inċidenza (u, jekk bil-punti, severità) ta' kull anormalità;

— Natura, severità, u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk hux tranżitorji jew permanenti);

Dejta dwar l-awtopsja

— Piż terminali tal-ġisem;

— Piżijiet ta' organi u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli;

— Sejbiet minn awtopsji; inċidenza u severità ta' anormalitajiet.

Istopatoloġija

— Sejbiet istopatoloġiċi mhux neoplastiċi,

— Sejbiet istopatoloġiċi neoplastiċi,

▼**M4**

— Korrelazzjoni bejn sejbiet makroskopiċi u mikroskopiċi;

— Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi kollha relatati ma' trattament inklużi gradazzjonijiet ta' severità;

— Rapport ta' kull evalwazzjoni bejn il-pari tas-slides

Trattament ta' statistika ta' riżultati, kif jixraq

Diskussjoni dwar riżultati inklużi:

— Diskussjoni dwar kull approċċ ta' mudellar

— Relazzjonijiet ta' doża-rispons

— Dejta storika ta' kontroll

— Konsiderazzjoni ta' kwalunkwe informazzjoni dwar il-modalità tal-azzjoni

— Determinazzjoni ta' BMD, NOAEL jew LOAEL

— Rilevanza għall-bnedmin

Konklużjonijiet

LETTERATURA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) Il-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali dwar Doża Ripetuta għal 90 Jum ta' Test ta' Subtossiċità Kronika Orali f'Annimali Mhux Rodituri.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness. Tossiċità tal-Inalazzjoni Subakuta: Studju ta' 28 jum.

(10) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subkronika: Studju ta' 90 Jum.

(11) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossiċità (Dermali) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).

▼M4

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN u Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼**M4**

(27) Id-Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼B

B.34. **TEST TA' TOSSIĊITÀ FUQ IR-RIPRODUZZJONI FUQ ĠENERAZZJONI WAĦDA**

1. **METODU**

1.1 INTRODUZZJONI

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.3 SUSTANZI GĦAR-REFERENZA

Xejn.

1.4 PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza ittestjata hi somministrata f'doži gradwati lil diversi gruppi ta' nisa u rġiel. L-irġiel għandhom ikunu iddożati waqt li jkunu qed jikbru u għallinqas għal ċiklu spermatoġenetiku wieħed (bejn wieħed u ieħor 56 ġurnata għall-ġurdien u 70 ġurnata għall-far) sabiex joħroġ kwalunkwe effetti negattiv tas-sustanza ittestjata fuq l-ispermatoġenesi.

Nisa tal-ġenerazzjoni parentali (P) għandhom ikunu iddożati għal-linqas għal żewġ ċikli totali ta' saħna sesswali sabiex joħroġ kwalunkwe effett negattiv tas-sustanza ittestjata fuq din is-saħna sesswali. Imbagħad l-annimali jiġu mgħammra. Is-sustanza ittest-jata tiġi somministrata liż-żewġ sessi waqt il-perjodu ta' tgħammir u minn hemm 'il quddiem lin-nisa waqt it-tqala u għall-perjodu ta' meta jkunu qed ireddgħu mill-ħalib ta' sidirhom. Għall-amminis-trazzjoni permezz ta' ġbid minn ġol-pulmuni, il-metodu jirrikjedi modifikazzjoni.

1.5 KRITERJI KWALITATTIVI

Xejn.

1.6 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Preparazzjonijiet

Qabel it-test, annimali zgħazagħ u b'saħħithom huma assenjati kif ġie ġie fil-gruppi trattati u fil-gruppi ta' kontroll. L-annimali huma miżmuma taħt kundizzjonijiet ta' akkomodazzjoni u ikel għallinqas għal ħamest ijiem qabel it-test. Huwa rakkomandat li s-sustanza ittestjata tkun somministrata fid-dieta jew fl-ilma tax-xorb. Tipi oħra ta' amministrazzjoni huma aċċettabbli wkoll. L-annimali kollha għandhom ikunu iddożati bl-istess metodu waqt il-perjodu sperimentali xieraq. Jekk jintużaw xi sustanzi jew addittivi oħrajn li jiffaċilitaw l-għoti tad-doża, dawn għandhom ikunu magħrufa li ma jipproduċux effetti tossiċi. L-għoti tad-doża għandu jkun fuq baži ta' sebat ijiem fil-ġimgħa.

▼B

Annimali sperimentali

Selection of species

Il-far jew ġurdien huma l-ispeċi preferuta. Għandhom ikunu użati annimali b'saħħithom li ma kienux suġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. Razez b'fertilitá baxxa m'għandhomx ikunu użati. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċi, ir-razza, sess, piż u/jew etá.

Għal valutazzjoni adegwata tal-fertilitá, kemm l-irġiel kif ukoll in-nisa għandhom ikunu studjati. Kull annimal għat-test u għall-kontroll għandu jkun fatmat qabel tibda tingħata d-doża.

Numru u sess

Kull grupp trattat u ta' kontroll għandu jkollu numru biżżejjed ta' annimali sabiex ikun hemm 20 mara tqila kważi lesta biex tixtri jew qrib.

L-għan hu li hu li jkun hemm biżżejjed tqala u frieħ biex tkun assigurata valutazzjoni sinifikanti tal-potenzal li għandha s-sustanza biex taffettwa l-fertilitá, it-tqala u l-imġieba maternali fl-annimali tal-ġenerazzjoni P u fl-annimali mhux miftumin, fl-iżvilupp u t-tkabbir ta' frieħ ta' l-F_1 mill-konċepiment sal-ftim.

Kundizzjonijiet tat-test

Ilma u ikel għandhom ikunu provdut ad libitum. Meta jkunu viċin li jwelldu, in-nisa tqal għandhom ikunu magħluqa separatament f'gaġeġ għall-ħlas u jistgħu jiġu provduti b'materjal biex jibnu il-bejta tagħhom.

Livelli ta' doża

Għandhom jiġu użati għallinqas tliet gruppi trattati u wieħed ta' kontroll. Jekk tintuża sustanza oħra biex tkun somministrata s-sutsanza ittestjata, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi din is-sustanza fl-għola volum użata. Jekk sustanza ittestjata tikkawża tnaqqis fil-konsum tad-dieta, allura jista' jkun neċessarju l-użu ta' grupp ta' kontroll parallel. Idealment, sakemm mhux limitat bin-natura kimika/fiżika jew bl-effetti bijoloġiċi tas-sustanza ittestjata, l-għola doża għandha tikkaġuna tossiċità imma mhux mortalitá fl-annimali parentali (P). Id-doża(i) intermedjarja(i) għandha tikkaġuna effetti tossiċi minimi li jistgħu jkunu attribwiti lis-sustanza ittestjata, u id-doża l-baxxa m'għandhiex tikkaġuna effetti negattivi osservabbli fuq il-ġenituri jew il-frieħ. Meta somministrata permezz ta' gavage jew kapsula, id-doża mogħtija lil kull animal għandha tkun ibbażata fuq il-piż tal-ġisem ta' l-annimal individwali u għandha tkun aġġustata kull ġimgħa minħabba tibdil fil-piż. Jekk mixtieq, fil-każ tan-nisa tqal, id-dożaġġi jistgħu jkunu ibbażati fuq il-piż tal-ġisem fil-ġurnata 0 jew 6 tat-tqala.

Test limitu

Fil-każ ta' sustanzi b'tossiċità baxxa, jekk il-livell ta' doża ta' għallinqas 1 000 mg/kilogramm ma jipproduċix evidenza ta' interferenza ma' l-imġieba riproduttiv, studji tad-doża f'livelli oħrajn jistgħu ma jiġux ikkunsidrati bżonnjużi. Jekk studju preliminari f'livell ta' doża qawwija, b'evidenza definite ta' tossiċità maternali, ma jurix effetti negattivi fuq il-fertilitá, studji tad-doża f'livelli oħra jistgħu ma jiġux ikkunsidrati bżonnjużi.

▼B

Eżekuzzjoni tat-test

Skedi sperimentali

L-għoti tad-doża ta' kuljum lill-irġiel parentali (P) għandu jibda meta jkollhom etá ta' madwar ħames sa disa ġimgħat, war li jkunu infatmu u akklimatizzati ta' l-iqas għal ħamest ijiem. Għall-firien, l-għoti tad-doża ikompli għal għaxar ġimgħat qabel il-perjodu ta' tgħammir (tmien ġimgħat għal ġrieden). L-irġiel għandhom jinqatlu u eżaminati jew fit-tmiem tal-perjodu ta' tgħammir jew inkella dawn jinżammu fuq id-dieta tat-test għall-produzzjoni possibbli tat-tieni wild u għandhom jinqatlu u eżaminati ftit qabel it-tmiem ta' l-istudju. Għal nisa parentali (P) l-għoti tad-doża għandu jibda għallinqas wara ħamest ijiem ta' akklimatizzazzjoni u jibqa' sejjer almenu għal ġimgħatejn qabel it-tgħammir. L-għoti ta' kuljum tad-doża lin-nisa P għandu jibqa' sejjer matul it-tliet ġimgħat ta' tgħammir, it-tqala sal-ftim tal-frieħ F_1. Il-modifikazzjoni ta' l-iskeda ta' l-għoti tad-doża fuq il-bażi ta' informazzjoni oħra fuq is-sustanza ittestjat, bħal induzzjoni tal-metaboliżmu jew bijo-akkumulazzjoni.

Proċedura ta' tgħammir

Fl-istudju ta' l-effetti tossiċi fuq ir-riproduzzjoni jistgħu jintużaw żewġ tipi ta' tgħammir, jew tgħammir 1:1 (raġel wieħed għal mara waħda) jew 1:2 (raġel wieħed għal żewġ nisa).

Ibbażat fuq tgħammir 1:1, mara waħda għandha titpoġġa ma' l-istess raġel sakemm ma sseħħ riproduzzjoni jew ikunu għaddew tliet ġimgħat. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tappijiet vaġinali. Il-ġurnata 0 tat-tqala hi definita bħala l-ġurnata meta jinstab tapp vaġinali jew tinstab l-isperma.

Dawk il-pari li ma jitgħammrux għandhom ikunu evalwati sabiex tiġi definita l-kawża tan-nuqqas ta' fertilitá apparenti.

Jista' jkun li din il-valutazzjoni tinvolvi proċeduri bħal li jiġu provduti opportunitajiet oħra sabiex jitgħammru ma' nisa jew irġiel oħra, eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi riproduttivi, u eżaminazzjoni taċ-ċiklu ta' saħna sesswali jew ta' spermatoġenesi.

Daqsijiet tal-gruppi ta' ulied/frieħ

Annimali li ingħatatilhom id-doża waqt l-istudju tal-fertilitá huma permessi li jwelldu normalment u jrabbu l-frieħ tagħhom sa l-istadju tal-ftim mingħajr standardizzazzjoni tal-gruppi ta' ulied/-frieħ.

Fejn issir standardizzazzjoni, il-proċedura sussegwenti hi rakkomandata. Bejn l-1 u r-4 ġurnata wara t-twelid, id-daqs ta' kull grupp ta' ulied/frieħ jista' jkun irranġat billi jkunu eliminati iż-żgħar żejda b'tali mod li jkun hemm sa fejn hu possibbli, erba' subien u erbgħat

ibniet kull grupp ta' ulied/frieħ. Fejn in-numru ta' frieħ subien jew bniet jipprevenu milli jkun hemm erba' minn kull sess għal kull grupp ta' ulied, hu aċċettabbli arranġament parzjali (per eżempju, ħames subien u tlett ibniet). L-arranġamenti m'humiex applikabbli għall-gruppi ta' ulied/frieħ ta' inqas minn tmien frieħ.

▼B

Osservazzjonijiet

Matul dan il-perjodu tat-test, kull animal għandu jkun osservat għallinqas darba kuljum. Tibdil relevanti fl-imġieba, sinjali ta' diffikultá jew titwil tal-proċess tat-twelid u kull sinjal ta' tossiċità, inkluż il-mortalitá għandhom ikunu irreġistrati. Waqt il-perjodi ta' qabel it-tgħammir u tat-tgħammir, il-konsum ta' l-ikel jista' jkun imkejjel kuljum. Wara t-twelid u waqt it-treddigħ, il-kejl tal-konsum ta' l-ikel (u ta' l-ilma meta s-sustanza ittestjata hi somministrata permezz ta' l-ilma tax-xorb) għandu jittieħed fl-istess ġurnata meta jintiżnu it-trabi l-ġodda. Irġiel u nisa P għandhom jintiżnu fl-ewwel ġurnata ta' l-għoti tad-doża u minn hemm 'il quddiem kull ġimgħa. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom jiġu rreġistrati individwalment għal kull animal adult.

It-tul tat-tqala għandu jkun ikkalkulat mill-ġurnata 0 tat-tqala. Kull grupp ta' ulied/frieħ għandu jkun eżaminat kemm jista' jkun malajr wara l-ħlas sabiex jiġi stabbilit in-numru u s-sess tal-frieħ, il-frieħ li twieldu mejta u dawk li twieldu ħajjin, u l-preżenza ta' anomaliji kbar.

Il-frieħ mejta u dawk sagrifikati għandhom ikunu preservati u studjati għal xi difetti possibbli. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jintiżnu il-gruppi ta' frieħ fl-għodwa ta' wara t-twelid, fir-4 u s-7 ġurnata kif ukoll kull ġimgħa minn hemm 'il quddiem sat-tmiem ta' l-istudju, meta l-annimali għandhom jintiżnu individwalment.

Anormalitajiet fiżiċi kif ukoll fl-imġieba osservati fl-ommijiet jew fil-frieħ għandhom jiġu rreġistrati.

Patoloġija

Awtopsja

Fil-ħin tas-sagrifiċċju jew tal-mewt waqt l-istudju, l-annimali tal-ġenerazzjoni P għandhom jiġu eżaminati makroskopikament għal kwalunkwe anormalitajiet strutturali jew kambjamenti patoloġiċi, b'attenzjoni speċjali tingħata lill-organi tas-sitema riproduttiva. Frieħ mejta jew moribondi għandhom jiġu eżaminati għad-difetti.

Istopatoloġija

L-ovarji, l-utru, iċ-ċerviċi, il-vaġina, it-testikoli, il-kanali twal ta' wara l-bajd minn fejn tgħaddi l-isperma, il-bżieżaq seminali, il-prostata, il-glandola li tagħqqad, glandola pitwitarja u l-organu(i) immirati ta' l-annimali P kollha għandhom ikunu preservati għal eżaminazzjoni mikroskopika. Fl-eventwalitá li dawn l-organi ma kinux eżaminati fi studji oħrajn b'doża multipla, dawn, fejn hu possibbli, għandhom ikunu eżaminati mikroskopikament fl-annimali kollha fil-gruppi trattati b'doża għolja u fil-gruppi ta' kontroll u f'annimali li jmutu waqt l-istudju.

Organi, f'dawn l-annimali, li juru anormalitajiet, imbagħad, għandhom ikunu eżaminati fl-annimali P l-oħra kollha. F'dawn il-każijiet, għandha ssir eżaminazzjoni mikroskopika tat-tessuti kollha li juru kambjamenti patoloġiċi kbar. Kif suġġerit fil-proċeduri ta' tgħammir, l-organi riproduttivi ta' l-annimali suspettati b'infertilitá jistgħu jkunu suġġetti għal eżaminazzjoni mikroskopika.

▼B

2. **DATA**

Id-data tista' tkun miġbura fil-qosor f'forma tabulari, fejn għandhom jiġu murija in-numru ta' annimali fil-bidu tat-test f'kull grupp, in-numru ta' rġiel fertili, in-numru ta' nisa tqal, it-tipi ta' kambjamenti u l-persentaġġ ta' annimali li juru kull tip ta' kambjament.

Fejn hu possibbli, ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' statistika xieraq. kwalunkwe metodu ta' statistika aċċettat jista' jintuża

3. **RAPPURTAĠĠ**

3.1 RAPPORT TAT-TEST

Jekk possibbli, ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni sussegwenti:

— speċi/razza użata;

— data tar-rispons tossiku skond is-sess u d-doża, inkluż il-fertilitá, it-tqala u l- vijabilità;

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali għex sal-ħin tas-sagrifiċċju skedat jew sat-tmiem ta' l-istudju;

— tabella li turi il-piż ta' kull grupp ta' wlied, il-ferż medju u l-piżijiet individwali tal-frieħ fit-tmiem l-istudju;

— effetti tossiċi fuq ir-riproduzzjoni, fuq il-frieħ u l-iżvilupp wara t-twelid;

— il-ġurnata ta' meta ġie osservat kull sinjal anormali u l-imġieba sussegwenti tiegħu;

— id-data ta' piż tal-ġisem għall-annimali P;

— sejbiet nekroskopiċi;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet mikroskopiċi kollha;

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn xieraq;

— diskussjoni tar-riżultati;

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2 VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

4. **REFERENZI**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

▼B

B.35. STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ REPRODUTTIVA FUQ ŻEWĠ ĠENERAZZJONIJIET

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika għal OECD TG 416 (2001)

1.1 INTRODUZZJONI

Dan il-metodu għal testijiet riproduttivi fuq żewġ ġenerazzjonijiet huwa iddisinjat li jipprovdi informazzjomni ġenerali li tikkonċerna l-effetti tas-sustanza tat-test fuq l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi ta' l-irġiel u n-nisa, inkluża l-funzjoni gonadali, iċ-ċiklu ta' l-estru, l-imġieba tat-tgħammir, il-konċepiment, il-ġestazzjoni, il-parturazzjoni, il-lattazzjoni, u l-ftim, u it-rtkabbir u l-iżvilupp tal-wild. L-istudju jista' wkoll jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tas-sustanza tat-test fuq il-morbidità ta' frieħ għadhom jitwieldu, il-mortalità, u d-dettalji preliminarji fuq l-iżvilupp tossiku ta' qabel it-twelid u ta' wara t-twelid u jservi bħala gwida għal testijiet sussegwenti. B'żieda ma l-istudju tat-tkabbir u l-iżvilupp tal-ġenerazzjoni F1, dan il-metodu tat-test huwa wkoll intiż li jassessja l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi maskili u femminili kif ukoll it-tkabbir u l-iżvilupp tal-ġenerazzjoni F2. Għal aktar informazzjoni dwar l-iżvilupp tossiku u d-defiċjenzi funzjonali, jew partijiet addizzjonali ta' l-istudju jistgħu inkorporati f'dan il-protokoll, b'konsulta mal-metodi tat-tossiċità ta' l-iżvilupp u/jew in-newrotassiċità ta' l-iżvilupp kif xieraq, jew inkella dawk il-miri finali jistgħu ikunu studjati fi studji separati, bl-użu ta' metodi xierqa tat-test.

1.2 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doži gradwali lil diversi gruppi maskili u femminili. L-irġiel tal-ġenerazzjoni P għandhom ikollhom id-doża waqt li jkunu jikbru u għal mill-anqas ċiklu speratoġenetiku sħiħ wieħed (madwar 56 jum fil-ġrieden u 70 jum fil-firien) sabiex ikunu misjuba l-effetti ħżiena fuq l-ispermatoġeneżi. L-effetti fuq l-isperma huma determinati bin-numru ta' parametri ta' l-isperma (eż. mortfoloġija u l-motilità ta' l-isperma) u l-preparazzjoni tan-nisġiet u ħistopatoloġija dettaljata. Jekk dettalji dwar l-ispermatoġeneżi jkunu disponibbli minn studju preċedenti dwar doża repetuta ta' tul ta' żmien suffiċjenti, eż. studju ta' 90 jum, l-irġiel tal-ġenerazzjoni P m'humiex meħtieġa li jkunu nklużi fl-evalwazzjoni. Huwa rakkommandabbli, b'dana kollu, li l-kampjuni jew ir-reġistrazzjoni diġitali ta' l-isperma tal-ġeberazzjoni P jkunu maħżuna, sabiex jiffaċilitaw evalwazzjoni fil-quddiem. Femminili tal-ġenerazzjoni P għandhom ikollhom id-doża matul it-tkabbir u għal diversi ċikli sħaħ ta' l-estru sabiex ikunu żvelati xi effetti ħżiena fuq in-normalità taċ-ċiklu ta' l-estru mis-sustanza tat-test. Is-sustanza tat-test hija somministrata lill-annimali parenti (P) matul it-tgħammir, matul it-tqala riżultanti, u matul il-ftim tal-wild tagħhom F1. Fil-ftim, l-amministrazzjoni tas-sustanza jitkompla lejn il-wild F1 matul it-tkabbir tagħhom lejn il-maturità, it-tgħammir u l-produzzjoni tal-ġenerazzjoni F2, sakemm il-ġenerazzjoni F2 tkun imfattma.

Osservazzjonijiet kliniċi u l-eżaminazzjonijiet patoloġiċi huma mwettqa fuq l-annimali kollha għal sinjali tat-tossiċità b'emfasi speċjali dwar l-effetti fuq l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi maskili u femminili u dwar it-tkabbir u l-iżvilupp tal-wild tagħhom.

▼B

1.3 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.3.1 **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

Il-far huwa l-ispeċje preferut għat-testijiet. Jekk ikunu użati speċje oħrajn, ġustifikazzjoni għandha tkun mogħtija u l-modifika xierqa ikunu meħtieġa. Tipi b'fekundità baxxa jew li huma sew magħrufa li għandhom inċidenza għolja ta' difetti fl-iżvilupp m'għandhomx ikunu użati. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati għandha tkun minima u ma teċċedix 20 % tal-piż medju ta' kull sess.

1.3.2 **Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata bil-ħtieġa li tkun assigurata inter-taħlita xierqa tas-sustanza tat-test meta somministrata b'dan il-metodu.

L-annimali jistgħu jinżammu individwalment jew li jkunu f'gaġġa bħala grupp żgħir ta' l-istess sess. Il-proċeduri ta' l-akkompanjament għandhom jitwettqu f'gaġġeġ adatti għal dak l-iskop. Wara l-evidenza tal-kopulazzjoni, in-nisa mgħammra għandhom jinżammu waħda kull gaġġa fil-gaġġeġ tal-maternità sa kemm iwelldu. Firien mgħammra jistgħu wkoll jinżammu fi gruppiu żgħat u imbagħad ikunu separati minn jum sa tnejn qabel il-parturazzjoni. L-annimali mgħammra għandhom ikunu ipprovduti bil-materjali xierqa u definiti sabiex ikunu jistgħu jippreparaw il-bejta, meta l-parturazzjoni tkun fil-qrib.

1.3.3 **Preparazzjoni ta' l-annimali**

Annimali b'saħħithom, li jkunu ġew akklamatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mil anqas 5 ijiem u li ma jkunux ġew suġġetti għal proċeduri preċedenti sperimentali, għandhom ikunu użati. L-annimali tat-test għandhom ikunu karatterizzati bħala speċje, razza, sorsi, seww, piż u/jew l-età. Kwalunkwe relazzjonijiet bejn l-aħwa fost l-annimali għandha tkun magħrufa sabiex it-tgħammir bejn l-aħwa jkun evitat. L-annimali għandhom ikunu assenjati kif jinzerta lejn il-grupp tal-kuntroll u tat-trattament (stratifikazzjoni bil-piż tal-ġisem hija rakkommandabbli). Il-gaġġeġ għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid fil-gaġġeġ ikunu minimizzat. Kull annimal għandu jkun assenjat numru uniku ta' l-identifikazzjoni. Għall-ġenerazzjoni P, dan għandu jsir qabel ma tibda d-doża. Għall-ġenertazzjoni F1, dan għandu jsir mat-ftim ta' dawk l-annimali li jkunu magħżula għat-tgħammir. Reġistri li jindikaw l-origini tal-botom għandhom jinżammu għall-annimali F1 kollha magħżula. B'żieda, identifikazzjoni individwali tal-frieħ malajr kemm jista' jkun possibbli malli jitwieldu hija rakkommandabbli, meta l-użin tal-frieħ individwali jew tat-testijiet funzjonali jkunu ikkonsidrati.

L-annimali parenti (p) għandhom ikunu f'età ta' madwar 5 sa 9 ġimgħat qabel il-bidu tad-doża. L-annimali tal-gruppi kollha tat-test għandhom, kemm jista' jkun prattikabbli, ikunu ta' piż u età uniformi.

▼B

1.4 PROĊEDURA

1.4.1 **In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Kull grupp tat-test u tal-kontroll għandu jinkludi numru suffiċjenti ta' annimali sabiex iforni, preferibbilment mhux anqas minn 20 mara tqila, jew qrib tal-parturazzjoni. Għal sustanzi li jikkaġunaw effetti mhux mixtieqa kif relatati mat-trattament (eż. sterilità, tossiċità eċċessiva f'doża għolja), dan jista' ma jkunx possibbli. L-għan huwa li jipproduċi tqalat biż-żejjed sabiex jassiguraw evalwazzjoni li tagħmel sens dwar il-potenzal tas-sustanza li taffettwa l-fertilità, it-tqala jew l-imġieba materna u wkoll l-irdiegħ, it-tkabbir u l-iżvilupp tal-wild F1 mill-konċepiment sal-maturità, u l-iżvilupp tal-botom tagħhom (F2) sa kemm ikunu mfattma. Għalhekk, nuqqas li jkun milħuq in-numru mixtieq ta' annimali tqal (i.e. 20) mhux neċessarjament jiżvalida l-istudju u għandu jkun evalwat fuq il-bażi ta' każ b'każ.

1.4.2 **Preparazzjoni tad-doża**

Huwa rakkommandat li s-sustanza tat-test tkun somministrata oralment (ma l-ikel, ma l-ilma tax-xorb, jew b'ikel sfurzat) sakemm rotta oħra ta' l-amministrazzjoni (eż. dermali jew man-nifs) tkun ikkonsidrata aktar xierqa.

Meta meħtieġ, is-sustanza tat-test tkun imdewwba jew sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkommandat li, kull meta possibbli, l-użu ta' taħlita/sospenzjoni akwea tkun meqjusa bħala l-ewwel għażla, sewgeita bil-kunsiderazzjoni ta' taħlita/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħirrum) w imbagħad b'xi taħlita oħra f'mezzi oħrajn. Għal likwidi oħrajn apparti milli l-ilma, il-karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. L-istabbilità tas-sustanza tat-test fil-mezz għandha tkun determinata.

1.4.3 **Id-Doża**

Mill-anqas tlett livelli ta' doži u l-kontroll simultanju għandhom ikunu użati. Sakemm ma tkunx limitata bin-natura fiżiko-kimika jew fl-effetti bioloġiċi tas-sustanza tat-test, l-għola livell ta' doża għandu jkun magħżul bil-għan li jinduċi tossiċità imma mhux il-mewt jew xi sofferenza qawwija. Fil-każ ta' mewt mhux mistennija, l-istudji b'rata ta' mortalità ta' anqas minn madwar 10 fil-mijja fl-annimali parentali (P) tkun normalment xorta waħda aċċettabbli. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħżulha bil-għan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett ħażin mhu osservat (NOAEL). Tnejn- sa erba intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-doži. Għal-studju djetarji, l-ibtervall tad-doża m'għanduk ikun ta' aktar minn tlett darbiet. Il-livelli tad-doża għandhom ikunu magħżula billi tkun meqjusa l-informazzjoni eżistenti tat-tossiċità, speċjalment ir-riżultati minn studji repetuti tad-doża. Kwalunkwe informazzjoni disponibbli dwar il-metaboliżmu u l-kinetiki tal-kompost tat-test jew tal-materjali relatati għandhom ukoll ikunu ikkunsidrati. Din l-infomazzjoni għandha wkoll tgħin fid-demostrazzjoni ta' l-adekwatezza ta' L-amministrazzjoni tad-dożar.

▼B

Dan il-grupp għandu jkun grupp ta' kontroll ittrattat taparsi jew mezz ta' grupp ta' kontroll jekk mezz ikun użat fl-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test. Apparti milli għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ukoll ikunu mqandla b'manjera identika għas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk ikun użat mezz, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi il-mezz fl-għola volum użat. Jek sustanza tat-test hija somministrata ma l-ikel, u toħloq tnaqqis ta' l-ammont djetarju jew ta' l-utilizzazzjoni, allura l-użu ta' grupp ta' kontroll mitmugħa bħala par jista' jkun ikkunsidrat bħala meħtieġ. L-informazzjoni alternattiv minn studji tal-kontroll iddisinjati għall-evalwazzjoni ta' l-effetti ta' konsum imnaqqas ta' l-ikel fuq il-parametri riproduttivi tista' tkun użata minflok il-grupp konkorrenti li jkunu mitmugħa bħala par.

Konsiderazzjoni għandha tkun mogħtija lil dawn il-karatteristiċi li ġejjin dwar il-mezz jew xi addittivi oħrajn: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu joħolqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ilma jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.4.4 **Test tal-limitu**

Jekk studju orali f'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/kull jum jew, għall-amministrazzjoni ta' l-ikel jew ilma tax-xorb, persentaġġ ekwivalenti fid-dieta jew fl-ima tax-xorb bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċu l-ebda effetti tossiċi osservabbli la fl-annimali parentali u l-anqas fil-wild tagħhom u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija kif ibbażata fuq informazzjoni minn komposti strutturament u/jew metabolikament relatati, allura studju sħiħ bl-użu ta' diversi livelli tad-doża jistgħu ikunu meqjusa bħala mhux meħtieġa. It-test tal-limitu huwa applikabbli apparti minn meta l-eposizzjoni umana tindika il-ħtieġa għal doża orali għola fil-livell użat. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma hija l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza tat-test, bħal kemm tinħall, ta' spiss tista' tindika u tillimita l-livell massimu attenibbli ta' l-espożizzjoni.

1.4.5 **Amministrazzjoni tad-doża**

L-annimali għandhom jingħataw id-doża bis-sustanza tat-test fuq il-bażi ta' 7-ijiem-fil-ġimgħa. Ir-rotta orali ta' l-amministrazzjoni (ma l-ikel, fl-ilma tax-xorb, jew bi tmiegħ sfurżat) hija preferuta. Jekk rotta oħra ta' l-amministrazzjoni hija użata, ġustifikazzjoni għandha tkun ipprovduta, u l-modifika xierqa jistgħu ikunu meħtieġa. L-annimali kollha għandhom jingħataw id-doża bl-istess metodu matul il-perjodu sperimentali kif xieraq. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata bi tmiegħ sfurzat, dan għandu jsir bl-użu ta' tubu ta' l-istonku. Il-volum ta' likwidu amministrat f'darba waħda m'għandux jeċċedi 1 ml.100 g piż tal-ġisem (4,4 ml/100 g piż tal-ġisem huwa l-massimu għaż-żejt tal-qamħ-ir-rum), apparti milli fil-każ ta' taħlitiet akweji meta 2 ml/100 g piż tal-ġisem jista' jkun użat. Apparti milli għal sustanzi irritanti jew korrossivi, li normalment ikununjiżvelaw effetti eżasperanti b'konċentrazzjonijiet għola, varjabbilità fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni sabiex tassigura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Fl-istudju bit-tmiegħ sfurzat, il-frieħ ikunu normalment jirċievu biss is-sustanza tat-test b'mod inderett minn meta jkunu jerdgħu, sakemm id-doża diretta tkun tibda għalihom meta jkunu miftuma. Fl-istudji tat-dieta jew ta' l-ilma tax-xorb, il-frieħ ikunu addizzjonalment jirċievu s-sustanza tat-test direttament meta huma jibdew jieklu waħedhom matul l-aħħar ġimgha tal-perjodu tal-lattazzjoni.Għal sustanzi amministrati permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, huwa importanti li jkun assigurat li l-kwantitajiet tas-sustanza tat-test kif involuti ma jkunux jinterferixxu nat-nutriment normali jew mal-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata fid-dieta, konċentrazzjoni djetarja kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal, jista' jkun użat; il-mod alternattiv użat għandu jkun speċifikat. Għal sustanza somministrata bi tmiegħ sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija

▼B

f'ħinijiet simili ta' kull jum, u aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa sabiex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Informazzjoni rigward id-distribuzzjoni plaċentali għandha tkun ikkonsidrata meta tkun aġġustata d-doża fi tmiegħ sfurzat ibbażżata fuq il-piż.

1.4.6 **Skedi sperimentali**

Id-doża ta' kull jum ta' l-irġiel u n-nisa parentali (P) għandha tibda meta dawn ikollhom età ta' 5 sa 9 ġimgħat. Id-doża ta' kull jum fl-irġiel u n-nisa F1 għandha tibda meta jkunu miftuma; din għandha tkun imfakkra fil-każi ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, espożizzjoni diretta tal-frieħ F1 għas-sustanza tat-test tista' diġa tkun seħħet matul il-perjodu tal-lattazzjoni. Għaż-żewġ sessi (P u F1), id-doża għandha tibqa għal mill-anqas 10 ġimgħat qabel il-perjodu tat-tgħammir. Id-doża tinżamm kontinwa għaż-żewġ sessi matul il-perjodu ta' ġimgħatejn waqt it-tgħammir. L-irgiel għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk u eżaminati meta ma jkunux aktar meħtieġa għall-assessjar ta' l-effetti riproduttivi.

Rigward in-nisa parentali (P), id-doża għandha tinżamm kostanti matul it-tqala u sal-ftim tal-frieħ F1. Konsiderazzjoni għandha tingħata għall-modifiki fl-iskeda tad-doża ibbażati fuq l-informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test, inkluži d-dettalji eżistenti tat-tossiċità, l-induzzjoni tal-metaboliżmu jew tal-bio-akkumulazzjoni. Id-doża lil annimali individwali għandha normalment tkun ibbażata fuq id-determinazzjoni tal-piż tal-ġisem kif l-aktar riċenti disponibbli. B'dana kollu, attenzjoni għandha tkun eżerċitata meta tkun aġġustata d-doża matul l-aħħar parti tremestra tat-tqala. It-trattament ta' l-irġiel u n-nisa P u F1 għandha tibqa sat-terminu.L-irġiel u n-nisa P u F1 adulti kollha għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk meta ma jkunux aktar meħtieġa dwar l-assessjar ta' l-effetti riproduttivi. Il-frieħ F1 mhux magħżula għat-tgħammir u l-frieħ kollha F2 għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk wara li jkunu nfatmu.

1.4.7 **Priċedura tat-tgħammir**

1.4.7.1 *It-tgħammir parentali (P)*

Għal kull tgħammir, kull mara għandha tkun imqiegħda ma raġel wieħed mill-istess livell ta' doża (tgħammir 1: 1) sakemm iseħħ il-kopulazzjoni jew wara li jkunu skadew 2 ġimgħat. Ta' kull jum, in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' buq vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala huwa definit bħala l-jum ta' meta tapp vaġinali jew sperma jkunu misjuba. Fil-każ li l-par ma jirnexxix, it-tgħammir mill-ġdid ta' nisa ma rġiel diġa ippruvari ta' l-istess grupp jista' jkun ikkunsidrat. Pari mgħammra għandhom ikunu kjarament identifikati f'dik id-data. It-tgħammir ta' aħwa għandu jkun evitat.

▼B

1.4.7.2 *Tgħammir F1*

Għat-tgħammir ta' l-ulied F1, mill-anqas raġel wieħed u mara waħda għandhom ikunu magħżula mal-ftiem minn kull boton għal tgħammir ma frieħ oħrajn ta' l-istess livell ta' doża imma minn boton differenti, sabiex jipproduċu l-ġenerazzjoni F2. L-għażla tal-frieħ minn kull boton għandha tkun kif jinzerta meta l-ebda differenzi sinifikanti ma jkunu osservati fil-piż tal-ġisem jew fid-dehra, bejn is-sieħba fl-istess botom. Fil-każ li differenzi jkunu osservati, laħjar rapreżentattivi minn kull botom għandhom ikunu magħżula. B'mod pragmatiku, dan laħjar isir fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem imma jista' jkun aktar xieraq fuq il-bażi ta' l-apparenza. Il-wild F1 m'għandux ikun mgħammar sakemm ikunu laħqu l-maturità sesswali kollha. Pari mingħajr proġenità għandhom ikunu evalwati sabiex tkun determinata l-kawża apparenti ta' l- infertilità. Dan jista' jinvolvi tali proċeduri bħala opportunitajiet addizzjonali saniex jitgħammru ma nisa jew irġiel oħrajn li diġa kienu taw provam b'eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi riproduttivi, u l-eżaminazzjoni ċikli ta' l-eteru jew ta' l-ispermatoġeneżi.

1.4.7.3 *It-tieni tgħammir*

F'ċerti okkażżjonijiet, bħala ma huma aterazzjoni relatati mat-trattament fid-daqs tal-botom jew fl-osservazzjoni ta' effett ekwivoku fl-ewwel tgħamir, huwa rakkommandabbli li l-adulti P jew F1 ikunu mgħammra mill-ġdid sabiex jipproduċu it-tieni botom. Huwa rakkommandabbli li jkunu mgħammra mill-ġdid in-nisa u l-irġiel, li ma jkunux ipproduċew botom meta mgħammra ma oħrajn diġa bi prova mis-sess oppost. Jekk il-produzzjoni tat-tieni botom tkun meqjusha bħala meħtieġa f'waħda mill-ġenerazzjonijiet, l-annimali għandhom ikunu m, għammra mill-ġdid fi żmien madwar ġimgħa wara l-ftim ta' l-aħħar botom.

1.4.7.4 *Id-daqs tal-botom*

L-annimali għandhom jitħallew li jipproduċu l-botom b'mod normali u li jkabbru t-tfal tagħhom sal-ftim. Standardizzazzjoni tad-daqs tal-botom hija volontarja. Meta ssir l-istandardizzazzjoni, il-metodu użat għandu jkun deskritt fid-dettall.

1.5 OSSERVAZZJONIJIET

1.5.1 **Osservazzjonijiet kliniċi**

Ossevazzjoni klinika ġenerali għandha ssir ta' kull jum u, fil-każ ta' tmiegħ tad-doża b'mod sfurzat, il-ħin tiegħu għandu jkun meqjus fl-għola perjodu antiċipat ta' l-effetti ta' wara d-doża. Tibdiliet fl-imġieba, sinjali ta' parturazzjoni diffiċli jew imtawwla u s-sinjali kollha ta' tossiċità għandhom ikunu irreġistrati. B'żieda, eżaminazzjoni aktar dettaljata ta' kull annimal għandha tkun imwettqa fuq bażi ta' mill-anqas darba fil-ġimgħa u tista' tkun imwettqa b'mod konvenjenti fl-okkażżjoni ta' meta l-annimal ikun miżun. Darbtejn kull jum, matul tmiem il-ġimgħa darba kull jum, meta xieraq, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u l-mortalità.

▼B

1.5.2 **Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/ilma fl-annimali parenti**

L-annimali parentali (P u F1) għandhom ikunu miżuna fl-ewwel jum tad-doża u mill-anqas darba fil-ġimgħa minn hemm il-quddiem. Nisa parentali (P u F1) għandhom ikunu miżuna bħala minimu fil-jiem tal-gestjoni 0, 7, 14, u 20 jew 21, u matul il-jiem meta jreddgħu jew fl-istess jiem bħal meta jsir l-użin tal-botom u fil-jum ta' meta l-annimali jkunu maqtula. Dawn l-osserbazzjonijiet għandhom ikunu irrapurtati individwalment għal kull annimal adult. Matul il-pperijodi ta' qabel it-tgħammir u tal-ġestjoni, il-konsum ta' l-ikel għandu jkun imkejjel mill-anqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ilma għandu jkun imkejjel bħala minimu jekk is-sustanza tat-test tkun somministrata fl-ilma.

1.5.3 **Iċ-ċikli esteru**

It-tul taċ-ċiklu esteru u n-normalità huma evalwati fin-nisa P u F1 b'ti1pisa vaġinali qabel ma jsir it-tgħammir, u l-aħjar waqt it-tgħammir, sakemm tkun instabet evidenza tat-tgħammir. Meta jkunu akkwistati ċ-ċelloli vaġinali ċervikali, attenzjoni għandha tingħata sabiex ikun evitat li ċaqlieq tal-mukuża u sussegwentament, l-induzzjoni ta' psewdo-tqala (1).

1.5.4 **Parametri ta' l-isperma**

L-irġiel P u F1 kollha, waqt it-teminazzjoni, il-piż tat-testis u ta' l-epididimi għandu jkun irreġistrat u kull wieħed mill-organi preservati għal eżaminazzjoni ħistopatoloġika (ara s-sezzjoni 1.5.7, 1.5.8.1). Minn subset ta' mill-anqas għaxart irġiel ta' kull grupp P u F1, il-kumplament tat-testes u l-epididimidi għandhom ikunu użati għall-ennumerazzjoni ta' l-ispermatidi omoġenizzazzjoni-reżistenti u tar-riservi ta' l-isperma tal-cauda epididimali, rispettivament. Għall-istess subset ta' rġile, l-isperma mill-cauda epididymides jew vas deferens għandhom ikunu miġbura għall-evalwazzjoni tal-motilità ta' l-isperma u l-morfoloġija ta' l-isperma. Jekk l-effetti relatati mat-trattament huma osservati jew meta jkun hemm evidenza minn studji oħrajn ta' effetti possibbli fuq l-ispermatoġeneżi, l-evalwazzjoni ta' l-isperma tista' tkun imwettqa fuq l-irġiel kollha f'kull grupp ta' doża; altrimenti l-enumerazzjoni tista' tkun ristretta fuq l-irġiel P u F1 tal-kontroll u dawk ta' doża għolja.

In-numru totali ta' spermatidi testikulari reżistenti-omogenizzazzjoni u l-isperma cauda epididimali għandhom ikunu innumerati (2) (3). Ir-riservi ta' l-isperma cauda jistgħu ikunu derivati mill-konċentrazzjoni u l-volum ta' l-isperma f'sospenzjoni użata sabiex ikunu mwettqa kompletament l-evalwazzjonijiet kwalitattivi, u n-numru ta' sperma rkuprat minn tgħaffiġ u/jew omoġenizzazzjoni sussegwenti tal-kumplament tal-materja cauda. L-enumerazzjoni għandha tkun imwettqa fuq subset magħżul ta' rġiel tal-gruppi ta' dożi kollha immedjetament wara l-qtil ta' l-annimali sakemm ma jkunx hemm ir-rekordings bil-video jew diġitali, jew sakemm il-kampjuni jkunu ffriżati għal analiżi aktar tard. F'dawn il-każi, il-grupp tal-kontrolli u tad-doża għolja għandhom ikunu analiżżati l-ewwel. Jekk l-ebda effetti reletatati mat-trattament (eż. effetti fuq l-għadd ta' l-isperma, il-motilità, jew il-morfoloġija) jkunu jidhru, il-gruppi tad-dożi l-oħrajn ma jkunx hemm ħtieġa li jkunu analizzati. Meta l-effetti relatati mat-trattament ikunu innotati fil-grupp ta' doża għolja, allura l-gruppi fid-doża aktar baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati.

▼B

Il-motilità epididimala (jew ductus deferens) għandha tkun evalwata jew irreġistrata fuq video immedjetament wara s-sagrifiċju. L-isperma għandha tkun irkuprata waqt li tkun minimiżżata l-ħsaram u mrattba għall-analiżi tal-motilità bl-użu ta' metodi accettabbli (4). Il-persentaġġ ta' sperma motilment progressiva għandu jkun determinat jew suġġettivament jew inkella oġġettivament. Meta l-analiżi ta' moviment mgħajjun mill-computer hija mwettqa (5) (6) (7) (8) (9) (10) id-derivazzjoni tal-motilità progressive tkun tistrieħ fuq il-għatbiet definiti bl-użu għal passaġġ ta' veloċità medja u l-linja dritta jew l-indiċi lineari. Jekk il-kampjunu jkun ġew fotografi fuq videotape (11) jew l-immapini ikunu b'mod ieħor reġistrati fil-waqt tan-nekropsija, analiżi sussegwenti biss ta' l-irġiel P u F1 tal-kontroll u ta' doża għolja tista' tkun imwettqa, sakemm ma jkunx osdservati l-effetti relatati mat-trattament; f'dak il-każ, il-gruppi tad-doża l-baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati. Fin-nuqqas ta' imaġġini video jew diġitali, il-kampjuni kollha fil-gruppi tat-trattament għandhom ikunu analiżżati man-nekropsija.

Evalwazzjoni morfoloġika tal-kampjun ta' l-isperma epididimali (jew van deferens) għandha tkun imwettqa. L-isperma (jew mill-anqas 200 kull kampjun) għandha tkun eżaminata kif stabbilita, preparazzjonijiet niedja (12) u klassifikata bħala jew normali in annormali. L-eżempji ta' l-annormalitajiet ta' l-isperma morfoloġika jkunu jindikaw fużjoni, irjus iżolati, u rjus u/jew denb mingħajr forma. L-evalwazzjoni għandha tkun imwettqa fuq subjet ta' rġile magħżula fil-gruppi tad-doži kollha jew immedkjetament wara l-qtil ta' l-annimali, jew, ibbażati fuq ir-rekordings tal-video jew diġitali, f'ħin aktar tard. It-tiċpis, la darna stabbilit, jista' wkoll ikun moqri aktar tard. F'dawn il-każi, il-grupp tal-kontrolli u tad-doża għolja għandhom ikunu analiżżati l-ewwel. Jekk l-ebda effetti reletatati mat-trattament (eż. effetti fuq l-għadd ta' l-isperma, il-motilità, jew il-morfoloġija) jkunu jidhru, il-gruppi tad-doži l-oħrajn ma jkunx hemm ħtieġa li jkunu analizzati. Meta l-effetti relatati mat-trattament ikunu innotati fil-grupp ta' doża għolja, allura l-gruppi fid-doża aktar baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati.

Jekk uħud mill-parametri ta' hawn fuq dwar l-evalwazzjoni ta' l-isperma jkunu diġa ġew eżaminati bħala parti minn studju sistematiku tat-tossiċità ta' mill-anqas 90 jum, dawn ma jkunu neċċessarjament jeħtieġu li jkunu repetuti fl-istidju ta' żewġ ġenerazzjonijiet. l-kampjuni jew ir-reġistrazzjoni diġitali ta' l-isperma tal-ġeberazzjoni P jkunu maħżuna, sabiex jiffaċilitaw evalwazzjoni fil-quddiem.

1.5.5 **Il-wild**

Kull botom għandu jkun eżaminat malajr kemm jista' jkun possibbli wara l-ħlas (jum tal-attazzjoni 0) sabiex ikun stabbilit in-numru u s-sess tal-frieħ, imweldin mejta, imweldin ħajjin, u il-preżenza ta' annomalitajiet kbar. Frieħ misjuba mejta fil-jum), jekk mhux maċerati, għandhom preferibbilment ikunu eżaminati għal difetti possibbli u l-kawża tal-mewt, u għandhom ikunu preservati. Frieħ ħajjin għandhom ikunu magħduda u miżuna individwalment mat-twelid (jum 0 tal-lattazzjoni) jew fil-jum 1, u fil-jiem regolati ta' l-użin minn hemm il-quddiem, eż. fil-jiem 4, 7, 14, u 21 tal-lattazzjoni. Annormalitajiet fiżiċi jew ta' l-imġieba osservati fl-ommijiet jew fil-frieħ għandhom ikunu reġistrati.

▼B

L-iżvilupp fiżiku tal-frieħ għandu jkun irreġistrat l-aktar biż-żieda fil-piż tal-ġisem. Parametri fiżiċi oħrajn (eż. il-fetħa ta' l-għajnejn u l-widnejn, il-ħruġ tas-snien, it-tkabbir tax-xagħar) jista' jformi informazzjoni supplementari, imma dawn id-dettalji għandhom preferibbilment ikunu evalwati fil-kuntest tad-dettalji tal-maturità sesswali (eż. l-età u l-piż tal-ġisem jew il-fetħa vaġinali jew is-separazzjoni balano-preputial) (14). Investigazzjonijiet funzjonali (eż. attivita motorili, funzjoni sensitorja, ontoġenija relfettiva) tal-ferħ F1 qabel u/jew wara l-ftim, partikolarment dawk relatati mal-maturità sesswali, huma rakkommandati jekk tali investigazzjonijiet ma jkunux inklużi fi studju separati. L-età tal-ftuħ vaġinali u s-separazzjoni prepuzjali għandha tkun determinata għal dawk imfatma F1 magħżula għat-tgħammir, Distanza anoġenitali għandha tkun imkejla fil-jum 0 ta' wara t-twelid fil-frieħ F2 jekk istigata b'alterazzjonijiet fir-relattività tas-sess F1 jew bil-kalkolu tal-maturità sesswali.

Osservazzjonijiet funzjonali jistgħu ikunu mħollija barra fi gruppi li altrimentri jiżvelaw sinjali ċari ta' effetti ħżiena (eż. tnaqqis sinifikanti fl-akkwist tal-piż, eċċ.). Jekk l-investigazzjonijiet funzjonali jkunu mwettqa, dawn m'għandhomx isiru fuq il-frieħ magħżula għat-tgħammir.

1.5.6 **Nekropsija maġġuri**

Fil-waqt tat-terminazzjoni jew tal-mewt matul l-istudji, l-annimali parentali kollha (P u F1), il-frieħ kollha b'annormalitajiet esterni jew sinjali kliniċi, kif ukoll wieħed magħżul b'mod kif jinzerta, ferħ/sess/botom, miż-żewġ ġenerazzjonijiet F1 u F2, għandu jkun eżaminat b'mod makroskopiku għal xi annormlitajiet structurali jew tibdil patiloġiku. Attenzjoni speċjali għandha tingħata lill-organi tas-sistema riproduttiva. Il-frieħ li jinqatlu b'mod umanesk f'kundizzjoni morbonda u l-frieħ mejta, meta ma jkunux maċerati, għandhom ikunu eżaminati għal difetti possibbli u/jew il-kawża tal-mewt, u ippreservati.

L-uteri tan-nisa li jkun għadhom mhux mgħammra għandhom ikunu eżaminati, f'tali manjera li ma tikkompromettix l-evalwazzjoni ħistopatoloġika, għall-preżenza u n-numru ta' siti ta' l-implantazzjoni.

1.5.7 **Il-piż ta' l-organi**

Fil-waqt tat-terminazzjoni, il-piż tal-ġisem u l-piż ta' dawn l-organi li ġejjin fl-annimali P u F1 parentali kollha għandu jkun determinat (l-organi bħala pari għandhom ikunu miżuna individwalment):

— l-utru, l-ovarji;

— it-testi, l-epididimidi (total u cauda);

— il-prostata';

— il-bużżieqa seminali bil-glandoli koaġjulanti u l-fluwidi tagħhom u l-prostata (bħala unità waħda);

— il-moħħ, il-fwied, il-kliewi, il-milsa, il-glandola pitwarja, it-tirojde u l-glandoli adrenali u dawk l-organi fil-mira kif maagħrufa.

Il-piżijiet ta' l-iġsma fit-terminazzjoni għandhom ikunu determinati għall-frieħ Fċ u F2 li huma magħżula għan-nekropsija. Dawn l-organi li ġejjin minn ferħ/sess/botom magħżula kif jinzerta (ara s-sezzjoni 1.5.6) għandhom ikuinu miżuna.

▼B

Il-moħħ, il-milsa u t-timu. Ir-riżultati tan-nekropsija ġenerali u l-piż ta' l-organi għandhom ikunu assessjati fil-kuntest ma l-osservazzjonijiet magħmula fi studji oħrajn ta' dożi repetuti, meta prattikabbli.

1.5.8 **Histopatoloġija**

1.5.8.1 *Annimali parentali*

L-organi u l-biċċiet li ġejjin ta' l-annimali parentali (P u F1), jew il-kampjuni rapreżentattivi tagħhom, għandhom ikun stabbiliti u maħżuna f'medja xierqa għall-eżaminazzjoni ħistopatoloġika.

— il-vaġina, l-utru bil-għonq, u l-ovarji (ippreservati ġo fissant xieraq);

— waħda mit-testi (ippreservata fil-fissattiv Bouis jew komparabbli), waħda minn ħaġa: epididima, l-borża seminali, l-prostata, u l-glandola koaġjulanti;

— oragnu(i) tal-mira preċedentament identifikati mill-annimali kollha P u F1 li huma magħżula għat-tgħammir.

Ħistopatoloġija sħiħa tal-organi u l-biċċiet presevati elenkati hawn fuq għandha tkun imwettqa għad-dożi l-għoljin kollha u l-annimali P u F1 magħżula għat-tgħammir. L-eżaminazzjoni ta' l-ovarji fl-annimali P hija voluntarja. L-organi li juru tibdiliet relatati mat-trattament għandhom ukoll ikunu eżaminati fil-gruppi tad-doża l-baxxa u l-medja sabiex jgħinu fl-elučidazzjoni tal-NOAEL. B'żieda, l-organi riproduttivi fl-annimali tad-doża baxxa u medja li huma issusspettati b'fertilità mnaqqsa, eż. dawk li ma jirnexxilhomx jitgħammru, li jkunu tqal, l-irgiel li ma jimpregnawx, jew li jwelldu frieħ b'saħħithom, jew dawk li ċ-ċikliċità estera jew in-numru ta' l-isperma, l-motilità, jew il-mofoloġija tagħhom kienet affettwata, għandhom ikunu suġġetti għal evalwazzjoni ħistopatoloġika. Il-ferita kbar kollha bħal ma huma l-atrofija jew it-tumuri għandhom ikunu eżaminati.

Eżaminazzjoni ħistopatoloġika testikulati dettaljata (e.g, bl-użu tal-fissattiv Bouin, it-twaħħil bill-paraaffin u s-sezzonijiet transervsjali ta' 4-5 μm ħxuna) għandhom ikunu mwettqa sabiex ikunu identifikati l-effetti relatati mat-trattament bħal ma huma l-ispermatidi miżmuma, is-saffi jew it-tipi nieqsa mil-ġermi taċ-ċelloli, iċ-ċelloli kbar multinukleati jew it-tgħaffiġ taċ-ċelloli spermatoġeniċi fil-lumen (14). L-eżami ta' l-epididimi intatta għandu jinkludi il-kaput, il-korp u l-kaanula, li jista' jkun imwettaq bl-evalwazzjoni tas-sezzjoni lonġitudinali. L-epididimi għandha tkun evalutata għall-infiltrazzjoni lewkoċita, tibdil fil-prevalenza tat-tipi taċ-ċelloli, it-tipi ta' ċelloli aberrenti, u l-isperma patoġikitożi. Il-PAS u t-tbgħajja ħematossilini jistgħu ikunu użati għall-eżaminazzjoni ta' l-organi riproduttivi maskili.

L-ovarju postlaktatjonali għandu jkollu l-folliki primordjali u tat-tkabbir kif ukoll il-corpora lutea l-kbira tal-lattazzjoni. L-eżaminazzjoni ħistopatoloġika għandha tiżvela t-tnaqqis kwalitattiv tal-popolazzjoni tal-follika primordjali. Evalwazzjoni kwantitattiva tal-folliki primordjali għandha tkun imwettqa għall-femminili F1; in-numru ta' l-annimali, l-għażla tas-sezzjoni ovarja, u s-sezzjoni tad-daqs tal-kampjun għandha tkun statistikament xierqa għall-proċedura ta' l-evalwazzjoni użata. L-eżaminazzjoni għandha tinkludi l-ennumerazzjoni tan-numru tal-folliki primordjali, li jistgħu ikunu aggrupparti mal-filliki ż-żgħar tat-tkabbir, għal paragun ta' l-ovarji ittrattati u tal-kontrol (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2 *Frieħ mhux miftuma*

Il-partijiet ferm annormali u l-organi tal-mira mill-frieħ kollha b'annormallitajiet esterni jew sinjali kliniċi, kif ukoll minn wieħed mill-grupp ferħ/sess/botom magħżul kif jinzerta miż-żewġ ġenerazzjonijiet F1 u F2 li ma jkunux ġew magħżula għat-tgħammir, għandhom ikunu iffissati u maħġżuna f'medja xierqa għall-eżaminazzjoni ħistopatoloġika. Il-karatteristika sħiħa ħistopatoloġika tal-partijiet ippreservati għandha tkun imwettqa b'enfasi speċjali dwar l-organi tas-sistema reproduttiva.

2. **DATA**

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Id-dettalji għandhom ikunu irrapurati individwalment għan-nisa kif ukoll għall-wild tagħhom u miġbura b'sommarju f'għamla tabulari, li juru għal kull grupp tat-test u għal kull ġenerazzjoni, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew qtil umanitarju, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità kif osservati, inkluż il-ħin ta' meta tkun skoppjat, it-tul ta' żmien, u s-severità ta' xi effetti tossiċi, it-tiġ ta' l-osservazzjonijiet ta' l-embrijuni/feti, u l-informazzjoni l-oħra kollha dwar it-trabi l-oħrajn.

Metodu statistiku ġeneralment aċċettabbli għandu jkun użat' il-metodi statistiċi għandhom ikunu magħżula bħala parti mid-disinn għall-istudju u għandhom ikunu iġġustifikati. Il-mudelli statistiċi bir-reazzjoni tad-doża jistgħu ikunu utili għad-data ta' l-analiżi. Ir-rapport għandu jinkludi informazzjoni suffiċjenti dwar il-metodu ta' l-analiżi u l-programm tal-kompjuter użat, hekk li riveditur/statistiku independenti jkun jista' jevalwa mill-ġdid u jikkostitwixxi mill-ġdid l-analiżi.

2.2 EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossiċità riproduttiva fuq żewġ ġenerazzjhonijiet għandu jkun evalutat f'termini ta' l-effetti osservati, inklużi s-sejbiet tan-nekropsija u mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni, jew in-nuqqas tagħha, bejn id-doża u s-sustanza tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità ta' l-annormalitajiet, inklużi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, il-fertilità affettwata, l-annormalitajiet kliniċi, l-imġieba tar-riproduzzjoni u l-botom affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħrajn. Il-propjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza tat-test, u meta disponibbli, id-dettalji tossikokinetiċi għandhom ikunu meqjusa fil-kunsiderazzjoni meta jkunu evalutati r-riżultati tat-test.

Test tat-tossiċità riproduttiva imwettqa kif suppost għandu jipprovdi estimi sodisfaċenti tal-livbell bla ebda effett u rikonoxximent ta' l-effeti ħżiena fuq ir-riproduzzjoni, l-parturizzjoni, il-lattazzjoni, l-iżvilupp postnatli inkluż it-tbakkir u l-iżvilupp sesswali.

▼B

2.3 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Studju tat-tossiċita riproduttiva fuq żewġ ġenerazzjonijiet għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' l-espożizzjoni ripetuta ta' sustanza matul il-fażijiet kollha taċ-ċiklu riproduttiv. Partikolarment, l-istudju jipprovdi informazzjoni dwar il-parametri riproduttivi, u dwar l-iżvilupp, it-tlabbir, il-maturità u s-sopravvivenza tal-frieħ. Ir-riżultati ta' l-istudju għandhom ikunu interpretatai b'konnessjoni mas-sejbier mill-istudji subkroniku, riproduttivi, tossikokinetiċi u studji oħrajn. Ir-riżultati ta' dan l-istudju jistgħu ikunu użati fl-assessjar tal-ħtieġa ta' aktar testijiet tal-kimika. L-estrapolazzjoni tar-riżultati ta' l-istudju mal-bniedem hija valida sa grad limitat. Dawn huma l-aħjar użati sabiex jipprovdu informazzjoni dwar il-livelli-mingħajr-effett u l-espożizzjoni umana (20) (21) (22) (23).

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;

— dettalji ta' l-identifikazzjoni;

— purità.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

— speċje/tipi użati;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, eċċ.;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;

— dettalji tat-test tal-preparazzjoni tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza, il-konċentazzjonijiet;

— l-istabbilità u l-omoġenità tal-preparazzjoni;

— dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-konċentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali 9 mg/kg il-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

▼B

Riżultati:

— il-konsum ta' l-ikel. Il-konsum ta' l-ilma, jekk disponibbli, l-effikaċja ta' l-ikel (iż-żieda fil-piż tal-ġisem għal kull gramma ikel ikkunsmat), u l-konsum tal-materjal tat-test għall-annimali P u F1, apparti milli għall-perjodu tal-koabitazzjoni u għal mill-anqas l-aħħar terz tal-lattazzjoni;

— id-dettalji ta' l-assorbazzjoni (jekk disponibbli);

— id-dettalji tal-piż tal-ġisem dwar l-annimali P u Fċ magħżula għat-tgħammir;

— id-dettalji tal-piż tal-botom u l-frieħ individwali;

— il-piż tal-ġsem fil-waqt li jkunu sagrifikati u l-piż assolut u rtelattiv ta' l-organi għall-annimali parentali;

— in-natura, s-severità u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (sew jekk reversibbli u anki jekk le);

— il-jum tal-mewt matul l-istudju jew jekk l-annimali jkunux baqgħu ħajjin sakem maqtula;

— dettalji tar-reazzjoni tossika bis-sess u d-doża, inklużi l-indiċi tat-tgammir, il-fertilità, il-ġestazzjoni, it-twelid, il-vijabbilità, u l-lattazzjoni; ir-rapport għandu jindika n-numri użati fil-kalkoli ta' dawn l-indiċi;

— l-effetti tossiċi jew oħrajn fuq ir-riproduzzjoni, il-frieħ, it-tbabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet ħistopatoloġiċi kollha;

— in-numru ta' nisa P u F1 fiċ-ċiklu normali u t-tul taċ-ċiklu;

— it-total tan-numru ta' l-isperma cauda epididimali, il-persentaġġ progressive tal-motilità ta' l-isperma, il-persentaġġ morfoloġikament normali, u l-persentaġġ ta' l-ispetma b'kull annormalità identifikata;

— iż-żmien satotgħammir, inklużi n-numru ta' jiem sakem isir it-tgħammir;

— it-tul tal-ġestjoni;

— in-numri ta' l-impjantazzjonijiet, corpora lutea, id-daqs tal-botom;

— in-numru ta' twelid ħajjin u t-telf tal-post-impjantazzjoni;

— in-numru ta' frieħ b'annormalitajiet ferm viżibbli, jekk determinati bin-numru tal-botom, għandu jkun irraportat;

— dettalji dwar l-aċċenni fiżiċi fil-frieħ u l-informazzjoni l-oħra ta' l-iżvilupp post natali; laċċenni fiżiċi evalwati għandhom ikunu ġustifikati;

— dettalji dwar l-osservazzjonijiet funzjonali fil-frieħ u l-adulti, kif applikabbli;

— trattamentv statistiku tar-riżultati, meta xieraq.

▼B

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet, inklużi l-valuri NOAEL għall-effetti materni u fuq il-frieħ.

4. **REFERENZI**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44.

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237- 244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOSSIKOKINETIĊI**

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għat-TG 417 (2010) tal-OECD. Studji li jeżaminaw it-tossikokinetika (TK) ta' kimika għall-ittestjar isiru biex tinkiseb informazzjoni adegwata dwar l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-trasformazzjoni bijoloġika (jiġifieri l-metaboliżmu) u l-eskrezzjoni tagħha biex jgħinu tkun relatata l-konċentrazzjoni jew id-doża mat-tossiċità osservata u bħala għajnuna biex jinftiehem il-mekkaniżmu tagħha ta' tossiċità. TK tista' tgħin biex jinftiehmu l-istudji tas-tossikoloġija billi turi li l-annimali tat-test ikunu esposti b'mod sistematiku għall-kimika għall-ittestjar u billi tiżvela liema jkunu l-gruppi li jiċċirkolaw (kimika/metaboliti prinċipali). Parametri bażiċi ta' TK iddeterminati minn dawn l-istudji għandhom jipprovdu wkoll informazzjoni dwar il-potenzjal għal akkumulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'tessuti u/jew f'organi u l-potenzjal għal induzzjoni ta' trasformazzjoni bijoloġika bħala riżultat ta' espożizzjoni għall-kimika għall-ittestjar.

2. Dejta ta' TK tista' tikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-adegwatezza u r-rilevanza ta' dejta ta' tossiċità tal-annimali għal estrapolazzjoni ta' periklu għall-bniedem u/jew għal valutazzjoni tar-riskju. Addizzjonalment, studji tossikokinetiċi jistgħu jipprovdu informazzjoni utli biex ikunu ddeterminati l-livelli ta' doża għal studji dwar tossiċità (kinetika lineari vs. mhux lineari), rotta ta' effetti ta' amministrazzjoni, disponibbiltà bijoloġika u kwistjonijiet relatati ma' tifsila tal-istudju. Ċertu tip ta' dejta TK tista' tintuża fl-iżvilupp ta' mudell tossikokinetiku b'bażi fiżjoloġika (PBTK).

3. Hemm użijiet importanti għal dejta dwar metaboliti/TK bħal dawk li jissuġġerixxu tossiċitajiet possibbli u modalitajiet ta' azzjoni u r-relazzjoni tagħhom għal livell ta' doża u rotta ta' espożizzjoni. Flimkien ma' dan, dejta dwar metaboliżmu tista' tipprovdi informazzjoni utli għal valutazzjoni tas-sinifikat tossikoloġiku ta' espożizzjonijiet għal metabiliti prodotti esoġenikament tal-kimika għall-ittestjar.

4. Dejta tossikokinetika adegwata tkun utli biex issostni l-aċċettabbiltà u l-applikabbiltà ulterjuri ta' relazzjonijiet kwantitattivi ta' attività strutturata, approċċi ta' read-across jew raggruppament fl-evalwazzjoni tas-sikurezza ta' kimiċi. Dejta kinetika tista' tintuża wkoll għall-evalwazzjoni tar-rilevanza tossikoloġika ta' studji oħra (eż. *in vivo*/*in vitro*).

5. Sakemm ma tissemmiex rotta oħra ta' amministrazzjoni (ara b'mod partikolari l-paragrafi 74-78), dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa applikabbli għal amministrazzjoni orali tal-kimika għall-ittestjar.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

6. Sistemi regolatorji għandhom rekwiżiti u ħtiġijiet differenti dwar il-kejl ta' punti ta' tmiem u parametri relatati ma' tossikokinetika għal klassijiet differenti ta' kimiċi (eż. pestiċidi, bijoċidi, kimiċi industrijali). Mhux bħal Metodi ta' Ttestjar kważi kollha dan il-Metodu ta' Ttestjar jiddeskrivi l-ittestjar ta' tossikokinetika, li jinvolvi kejlijiet u punti ta' tmiem multipli. Fil-ġejjieni jistgħu jkunu żviluppati diversi Metodi ta' Ttestjar ġodda u/jew dokument(i) ta' gwida biex jiddeskrivi/u kull punt ta' tmiem separatament u f'aktar dettalji. Fil-każ ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, liema testijiet jew valutazzjonijiet isiru huwa speċifikat mir-rekwiżiti u/jew ħtiġijiet ta' kull sistema regolatorja.

▼M4

7. Hemm diversi studji li jistgħu jsiru biex tkun ivvalutata l-imġiba ta' TK ta' kimika għall-ittestjar għal finijiet regolatorji. Iżda, skont il-ħtiġijiet jew is-sitwazzjonijiet regolatorji partikolari, mhux dawn l-istudji kollha li jistgħu jkunu meħtieġa għall-evalwazzjoni ta' kimika għall-ittestjar. Il-flessibbiltà, meqjusin il-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar li tkun qed tiġi investigata, hija meħtieġa fit-tfassil ta' studji ta' tossikokinetika. F'xi każijiet, ċertu sett biss ta' mistoqsijiet jista' jkun jeħtieġlu jiġi esplorat biex ikun indirizzat tħassib dwar perikli u riskji assoċjati ma' kimika għall-ittestjar. F'xi sitwazzjonijiet, dejta dwar TK tista' tinġabar bħala parti mill-evalwazzjoni fi studji oħra ta' tossikoloġija. Għal sitwazzjonijiet oħra, jistgħu jkunu meħtieġa studji addizzjonali u/jew aktar estensivi dwar TK, skont ħtiġijiet regolatorji u/jew jekk jinqalgħu mistoqsijiet ġodda bħala parti minn evalwazzjoni ta' kimika għall-ittestjar.

8. L-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar u metaboliti u analogi rilevanti għandhom jitqiesu mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju biex tissaħħaħ il-kwalità tal-istudju u jkun evitat użu mhux meħtieġ ta' annimali. Dan jista' jinkludi dejta minn Metodi ta' Ttestjar rilevanti oħra (studji *in vivo*, studji *in vitro*, u/jew evalwazzjonijiet *in silico*). Proprjetajiet fiżikokimiċi, bħal koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma (espress bħala log P_{OW}), pKa, solubilità fl-ilma, pressjoni ta' fwar u piż molekulari ta' kimika jistgħu jkunu utli għall-ippjanar ta' studji u interpretazzjoni ta' riżultati. Dawn jistgħu jkunu ddeterminati billi jintużaw metodi adatti kif deskritti fil-Metodi ta' Ttestjar rilevanti.

LIMITAZZJONIJIET

9. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux imfassal biex jindirizza ċirkostanzi speċjali, bħall-annimal mara tqila jew tredda' u wildha, jew biex jevalwa residwi potenzjali f'annimali esposti li jipproduċu ikel. Iżda d-dejta miksuba minn studju B.36 tista' tipprovdi informazzjoni ta' sfond biex tiggwida t-tifsila ta' studji speċifiċi għal dawn l-investigazzjonijiet. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux maħsub għall-ittestjar ta' nanomaterjali. Rapport dwar eżami mill-ġdid preliminari ta' Linji Gwida ta' Testijiet tal-OECD għall-applikabbiltà tagħhom għal nanomaterjali jindika li t-TG 417 (ekwivalenti għal dan il-Metodu ta' Ttestjar B.36) tista' ma tkunx tapplika għal nanomaterjali (1).

DEFINIZZJONIJIET

10. Definizzjonijiet użati għall-fini ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma pprovduti fl-Appendiċi.

KONSIDERAZZJONIJIET TA' TRATTAMENT XIERAQ TAL-ANNIMALI

11. Gwida dwar trattament uman tal-annimali hija disponibbli fid-Dokument ta' Gwida (GD) 19 (2) tal-OECD. Huwa rrakkomandat li GD 19 tal-OECD ikun ikkonsultat għall-istudji kollha *in vivo* jew *in vitro* deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar.

DESKRIZZJONI tal-METODI

Studji pilota

12. L-użu ta' studji pilota bħal dawn huwa rrakkomandat u inkuraġġit għall-għażla ta' parametri sperimentali għall-istudji ta' tossikokinetika (eż. metaboliżmu, bilanċ ta' piż, proċeduri analitiċi, tiftix ta' doża, eżalazzjoni ta'CO_2, eċċ.). Karatterizzazzjoni ta' xi wħud minn dawn il-parametri tista' ma ġġibx il-ħtieġa tal-użu ta' kimiċi b'tikketta radjoloġika.

▼M4

Għażla ta' annimali

Speċijiet

13. L-ispeċi ta' annimali (u razza) użata għal ittestjar ta' TK għandha preferibbilment tkun l-istess bħal dik użata fi studji tossikoloġiċi oħra magħmulin bil-kimika għall-ittestjar ta' interess. Normalment għandu jintuża l-far minħabba li kien użat b'mod estensiv għal studji tossikoloġiċi. L-użu ta' speċi oħra jew addizzjonali jista' jkun awtorizzat jekk studji tossikoloġiċi kritiċi juru evidenza ta' tossiċità sinifikanti f'dawn l-ispeċijiet jew jekk jintwera li t-tossiċità/tossikokinetika tagħhom tkun aktar rilevanti għall-bnedmin. Għandha tingħata ġustifikazzjoni għall-għażla tal-ispeċi ta' annimal u razztu.

14. Sakemm ma jingħadx mod ieħor, dan il-Metodu ta' Ttestjar jirreferi għall-far bħala l-ispeċi tat-test. Ċerti aspetti tal-metodu jistgħu jkollhom jiġu mmodifikati biex jintużaw speċijiet oħra għal test.

Età u Razza

15. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom (normalment minn 6-12-il ġimgħa meta jsir id-dożaġġ) (ara wkoll il-paragrafi 13 u 14). Għandha tingħata ġustifikazzjoni għall-użu ta' annimali li ma jkunux adulti żgħażagħ. L-annimali kollha għandhom ikunu tal-istess età mal-bidu tal-istudju. Il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali individwalment m'għandhiex tkun aktar minn ± 20 % tal-piż medju tal-grupp tat-test. Idealment ir-razza użata għandha tkun l-istess bħal dik użata biex tkun idderivata d-database tossikoloġika għall-kimika għall-ittestjar.

Għadd u sess tal-annimali

16. M'għandhomx jintużaw anqas minn erba' annimali ta' sess wieħed għal kull doża ttestjata. Għandha tingħata ġustifikazzjoni għas-sess tal-annimali użat. Għandu jitqies l-użu taż-żewġ sessi (erba' rġiel u erba' nisa) jekk ikun hemm evidenza li ssostni differenzi sustanzjali fit-tossiċità b'rabta mas-sessi.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf

17. L-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu jgħixu individwalment matul il-perjodu tal-ittestjar. Abitazzjoni fi gruppi tista' tkun iġġustifikata f'ċirkostanzi speċjali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam. It-temperatura tal-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C) u l-umdità relattiva 30-70 %. Dwar għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb.

Kimika għall-ittestjar

18. Kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika bl-użu ta' ^{14}C għandha tintuża għall-bilanċi kollha ta' massa u għall-aspetti ta' identifikazzjoni ta' metaboliti tal-istudju; iżda, jekk ikun jista' jintwera li:

— l-identifikazzjoni ta' bilanċ ta' massa u ta' metaboliti tkun tista' tiġi evalwata b'mod adegwat billi tintuża l-kimika għall-ittestjar mingħajr tikketta,

— l-ispeċifiċità u s-sensittività analitiċi tal-metodu użat ma' kimika għall-ittestjar mhux radjuattiva jkunu daqs jew akbar minn dawk li jkunu jistgħu jinkisbu bil-kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika,

▼M4

f'dak il-każ ma jkunx hemm ħtieġa li tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika. Barra dan, jistgħu jintużaw iżotopi oħra radjuattivi u stabbli, partikolarment jekk l-element ikun responsabbli għal jew ikun parti mill-porzjon tossiku tal-kimika għall-ittestjar. Jekk ikun possibbli, it-tikketta radjoloġika għandha titqiegħed f'porzjon ċentrali tal-molekula li tkun metabolikament stabbli (ma tkunx tista' tinbidel, ma titneħħiex metabolikament bħala CO_2, u ma ssirx parti mill-ġemgħa ta' karbonju biss tal-organiżmu). Tikkettar ta' siti multipli jew reġjuni speċifiċi tal-molekula jistgħu jkunu meħtieġa biex ikun segwit x'jiġri mil-kimika għall-ittestjar.

19. Il-kimiċi għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika jew mhux b'tikketta radjoloġika għandhom ikunu analizzati billi jintużaw metodi adatti biex ikunu stabbiliti l-purezza u l-identità. Il-purezza radju tal-kimika għall-ittestjar radjuattiva għandha tkun l-ogħla li tista' tinkiseb għal kimika partikolari għall-ittestjar (idealment hija għandha tkun aktar minn 95 %) u għandu jsir sforz raġonevoli biex ikunu identifikati impuritajiet li jkun hemm ta' 2 % jew aktar. Il-purezza, flimkien mal-identità u l-porzjon ta' kull impurezza li tkun ġiet identifikata, għandhom ikunu rrappurtati. Programmi regolatorji individwalment jistgħu jagħżlu li jipprovdu gwida addizzjonali bħala għajnuna għad-definizzjoni u l-ispeċifikazzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar magħmulin minn taħlitiet u metodi għad-determinazzjoni tal-purezza.

Għażla ta' doża

Studju Pilota

20. Is-soltu doża orali waħda tkun suffiċjenti għall-istudju pilota. Id-doża m'għandhiex tkun tossika, iżda tkun għolja biżżejjed biex titħalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u plażma, skont il-każ), kif ukoll biex jitħares l-għan dikjarat tal-studju pilota kif innotat fil-paragrafu 12 ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Studji Ewlenin

21. Għall-istudji ewlenin, ikun ippreferut minimu ta' żewġ dożi minħabba li informazzjoni miġbura minn mill-anqas żewġ gruppi ta' doża tista' tgħin biex tkun stabbilita doża fi studji oħra dwar tossiċità, u tgħin fil-valutazzjoni ta' doża-rispons ta' testijiet ta' tossiċità diġà disponibbli.

22. Meta jkunu amministrati żewġ dożi, iż-żewġ dożi għandhom ikunu għoljin biżżejjed biex titħalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u fil-plażma, skont il-każ). Għandha titqies informazzjoni minn dejta disponibbli dwar tossiċità għal għażla ta' doża. Jekk ma jkunx hemm informazzjoni (eż. minn studji ta' tossiċità orali akuta li jirreġistraw sinjali kliniċi ta' tossiċità, jew minn studji dwar tossiċità ta' doża ripetuta) ikun jista' jitqies valur għall-ogħla doża li tkun taħt l-istima ta' LD_{50} (rotot orali u dermali) jew LC_{50} (rotta tal-inalazzjoni) jew taħt il-valur aktar baxx tal-stima tal-firxa ta' tossiċità akuta. Id-doża aktar baxxa għandha tkun xi frazzjoni tad-doża ogħla.

23. Jekk ikun investigat livell wieħed ta' doża, idealment id-doża għandha tkun għolja biżżejjed biex titħalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u fil-plażma, skont il-każ), filwaqt li ma tkunx prodotta tossiċità li tkun tidher. Għandu jkun ipprovdut motiv għala ma jkunx ġie inkluż it-tieni livell ta' doża.

24. Jekk l-effett ta' doża fuq proċessi kinetiċi jkun jeħtieġlu jiġi stabbilit, żewġ dożi jistgħu ma jkunux suffiċjenti u mill-anqas doża waħda għandha tkun għolja biżżejjed biex tissatura dawk il-proċessi. Jekk l-erja taħt il-kurva tal-plażma ta' konċentrazzjoni-ħin (AUC) ma tkunx lineari bejn żewġ livelli ta' doża użati fl-istudju ewlieni, din tkun indikazzjoni qawwija li tkun qed isseħħ saturazzjoni ta' proċess kinetiku wieħed jew aktar xi mkien bejn iż-żewġ livelli ta' doża.

▼M4

25. Għal kimiċi għall-ittestjar ta' tossiċità baxxa, għandha tintuża doża massima ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem (rotot orali u dermali) (jekk l-amministrazzjoni tkun bir-rotta tal-inalazzjoni, irreferi għall-Kapitolu B.2 ta' dan l-Anness għal gwida; tipikament din id-doża ma tkunx taqbeż 2 mg/l). Konsiderazzjonijiet speċifiċi għal kimika jistgħu joħolqu l-ħtieġa ta' doża oġħla skont ħtiġijiet regolatorji. Għażla ta' doża għandha dejjem tkun iġġustifikata.

26. Dejta dwar doża waħda tossikokinetika u ta' distribuzzjoni ta' tessuti tista' tkun adegwati biex ikun iddeterminat il-potenzjal għal akkumulazzjoni u/jew persistenza. Iżda f'xi ċirkostanzi tista' tkun meħtieġa amministrazzjoni ta' doża ripetuta i) biex ikun indirizzat b'mod aktar sħiħ il-potenzjal għal akkumulazzjoni u/jew persistenza jew bidliet f'TK (jiġifieri, pereżempju, induzzjoni u inibizzjoni ta' enżimi) jew ii) kif ikun mitlub mis-sistema regolatorja applikabbli. Fi studji li jinvolvu dożaġġ, filwaqt li amministrazzjoni ta' doża baxxa ripetuta s-soltu tkun suffiċjenti, f'ċerti ċirkostanzi tista' wkoll tkun meħtieġa amministrazzjoni ta' doża għolja ripetuta (ara wkoll il-paragrafu 57).

Amministrazzjoni ta' Kimika għall-Ittestjar

27. Il-kimika għall-ittestjar għandha tinħall jew tiġi sospiża b'mod omoġenju fl-istess vejjikolu użat għall-istudji l-oħra dwar tossiċità ta' gavage orali magħmulin bil-kimika għall-ittestjar, jekk tkun disponibbli informazzjoni dwar vejjikolu bħal dan. Għandu jkun ipprovdut motiv għall-għażla tal-vejjikolu. L-għażla tal-vejjikolu u l-volum ta' dożaġġ għandhom jitqiesu fit-tfassil tal-istudju. Il-metodu tas-soltu ta' amministrazzjoni huwa b'gavage; iżda amministrazzjoni b'kapsula tal-ġelatina jew bħala taħlita ta' dieta tista' tkun vantaġġuża f'sitwazzjonijiet speċifiċi (fiż-żewġ każijiet għandha tingħata ġustifikazzjoni). Għandha tkun ipprovduta verifika tad-doża attwali amministrata lil kull annimal.

28. Il-volum massimu ta' likwidu li għandu jkun amministrat b'gavage orali f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimali tat-test, mit-tip ta' vejjikolu ta' doża u minn jekk jingħatax għalf jew le qabel ma tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar. Għandu jingħata l-motiv għala jkun amministrat jew ristrett ikel qabel id-dożaġġ. Normalment il-volum għandu jinżamm baxx daqs kemm ikun prattikabbli għal vejjikoli jew tal-ilma jew mhux tal-ilma. Volumi ta' doża m'għandhomx normalment ikunu aktar minn 10 ml/kg tal-piż tal-ġisem għal rodituri. Volumi ta' vejjikoli użati għal aktar kimiċi għall-ittestjar lipofiliċi jistgħu jibdew minn 4 ml/kg tal-piż tal-ġisem. Għal dożaġġ ripetut, meta l-indikazzjoni tkun li m'għandux ikun hemm sawm kuljum, għandhom jitqiesu volumi ta' doża aktar baxxa (eż. 2-4 ml/kg tal-piż tal-ġisem). Meta jkun possibbli, għandu jitqies l-użu ta' volum ta' doża konsistenti ma' dak amministrat fi studji oħra dwar gavage orali għal kimika għall-ittestjar.

29. L-amministrazzjoni intravenuża (IV) tal-kimika għall-ittestjar u l-kejl tal-kimika għall-ittestjar fid-demm u/jew l-eskreta jistgħu jintużaw biex jistabbilixxu d-disponibbilità bijoloġika jew l-assorbiment orali relattiv. Għall-istudju IV, tkun amministrata doża waħda (is-soltu ekwivalenti għad-doża orali baxxa iżda li ma taqbiżhiex – ara għażla ta' doża) ta' kimika għall-ittestjar billi jintuża vejjikolu adattat. Dan il-materjal għandu jkun amministrat f'volum xieraq (eż. 1 ml/kg bw) fis-sit magħżul ta' amministrazzjoni lil mill-anqas erba' annimali tas-sess adattat (jistgħu jintużaw iż-żewġ sessi, jekk dan ikun permess, ara l-paragrafu 16). Tkun meħtieġa preparazzjoni ta' doża maħlula kollha jew sospiża għal amministrazzjoni IV tal-kimika għall-ittestjar. Il-vejjikolu għal amministrazzjoni IV m'għandux ifixkel l-integrità tad-demm jew il-fluss tad-demm. Jekk il-kimika għall-ittestjar hija infuża, ir-rata ta' infużjoni għandha tkun irreġistrata u standardizzata fost l-annimali, sakemm tintuża pompa tal-infużjoni. Għandha tintuża l-anestesija jekk wieħed idaħħal tubu rqiq fil-vina ġugulari (għal amministrazzjoni ta' kimika

▼M4

għall-ittestjar u/jew għal ġbir ta' demm) jew jekk wieħed juża l-arterja femorali għal amministrazzjoni. Għandha titqies bir-reqqa t-tip ta' anestesija minħabba li din tista' jkollha effetti fuq it-tossikokinetika. L-annimali għandhom jitħallew jirkupraw b'mod adegwat qabel amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar flimkien mal-vejjikolu.

30. Jistgħu japplikaw rotot oħra ta' amministrazzjoni, bħal dawk dermali u ta' inalazzjoni, (ara l-paragrafi 74-78) għal ċerti kimiċi għall-ittestjar, meqjusin il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom u l-użu jew espożizzjoni umana mistennija tagħhom.

Kejlijiet

Bilanċ tal-massa

31. Il-bilanċ tal-massa huwa ddeterminat bl-għadd tal-perċentwali tad-doża (radjuattiva) amministrata li toħroġ fl-awrina, fir-rawt u man-nifs, u bil-perċentwali li jkun hemm f'tessuti, karkassa residwali u ħasil ta' gaġeġ (ara l-paragrafu 46). Ġeneralment, irkupri totali ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) amministrata fl-ammont ta' > 90 % jitqiesu bħala adegwati.

Assorbiment

32. Stima inizjali ta' assorbiment tista' tinkiseb billi jkun eskluż il-perċentwali tad-doża fis-sistema gastrointestinali (GI) u/jew fir-rawt mid-determinazzjoni tal-bilanċ tal-massa. Għall-kalkulazzjoni tal-assorbiment ta' perċentwali, ara l-paragrafu 33. Għal investigazzjoni ta' eskreta, ara l-paragrafi 44-49. Jekk l-ammont eżatt ta' assorbiment wara li tkun ingħatat doża orali ma jkunx jista' jiġi stabbilit minn studji ta' bilanċ ta' massa (eż. fejn aktar minn 20 % tad-doża amministrata tkun fir-rawt), jista' jkun hemm ħtieġa ta' investigazzjonijiet ulterjuri. Dawn l-istudji jistgħu jikkomprendu jew 1) amministrazzjoni orali ta' kimika għall-ittestjar u kejl ta' kimika għall-ittestjar fil-bili jew 2) amministrazzjoni orali u IV ta' kimika għall-ittestjar u kejl ta' kimika għall-ittestjar netta li tkun fl-awrina magħduda l-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra flimkien mal-karkassa minn kull waħda miż-żewġ rotot. F'waħda miż-żewġ tifsiliet tal-istudju, il-kejl tar-radjuattività jsir bħala metodu sostitut għal analiżi speċifika għal kimika ta' kimika għall-ittestjar flimkien ma' metaboliti.

33. Jekk jinbeda studju dwar eskrezzjoni ta' bili, tipikament tintuża r-rotta orali. F'dan istudju, il-kanali tal-bili ta' mill-anqas erba' annimali tas-sess adattat (jew taż-żewġ sessi, jekk dan ikun permess) għandu jiddaħħlilhom tubu rqiq u għandha tkun amministrata doża waħda tal-kimika għall-ittestjar. Wara li tkun saret l-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, eskrezzjoni ta' radjuattività/kimika għall-ittestjar fil-bili għandha tkun immonitorjata sakemm jeħtieġ biex issir stima tal-perċentwali tad-doża amministrata li tkun ħarġet bħala eskreta permezz ta' din ir-rotta, li tista' tintuża biex ikun ikkalkulat direttament kemm ikun sar assorbiment orali, kif ġej:

$$\text{Assorbiment ta' perċentwali} = \begin{array}{l}(\text{arja ta' teħid tan} - \text{nifs} + \text{urine} + \text{'il barra} \\ +\text{karkassa mingħajr kontenuti tas} - \text{sistema} \\ \text{GI})/\text{ammont amministrat} \times 100\end{array}$$

34. Għal xi klassijiet ta' kimika għall-ittestjar, sekrezzjoni diretta tad-doża assorbita tista' sseħħ f'membrani intestinali kollha. F'każijiet bħal dawn il-kejl ta' perċentwali ta' doża f'rawt wara doża orali lill-far b'tubu rqiq fil-kanal tal-bili ma jitqisx li jkun rappreżentattiv tad-doża mhux assorbita. Huwa rrakkomandat li fejn ikun maħsub li sseħħet sekrezzjoni intestinali, f'dak il-każ il-perċentwali ta' doża assorbita tkun ibbażata fuq l-assorbiment ikkalkulat mill-paragun tal-eskrezzjoni, wara li tkun saret ir-rotta orali, mar-rotta IV (far intatt jew b'tubu rqiq fil-kanal tal-bili) (ara l-paragrafu 35). Huwa rrakkomandat ukoll li meta jitqies li tkun meħtieġa l-kwantifikazzjoni tas-sekrezzjoni intestinali, jitkejjel il-far b'tubu rqiq fil-kanali tal-bili wara amministrazzjoni ta' doża IV.

▼M4

Disponibbiltà bijoloġika

35. Id-disponibbiltà bijoloġika tista' tkun iddeterminata mill-kinetika tal-plażma/tad-demm mill-gruppi orali u IV, kif deskritti fil-paragrafi 50-52, b'analiżi kimika speċifika tal-kimika għall-ittestjar u/jew ta' metabolite/i rilevanti, li, għalhekk, ma tkunx teħtieġ kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika. Il-kalkulazzjoni tad-disponibbiltà bijoloġika (F) tal-kimika għall-ittestjar jew ta' metabolite/i rilevanti tista' mbagħad issir kif ġej:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

fejn 'AUC' tkun l-erja taħt il-kurva tal-plażma ta' konċentrazzjoni-ħin, u 'exp' tkun ir-rotta sperimentali (orali, dermali jew permezz ta' inalazzjoni).

36. Għal użu f'valutazzjoni tar-riskju ta' effetti sistemiċi, id-disponibbiltà bijoloġika tal-komponent tossiku tkun ġeneralment ippreferuta flok l-assorbiment ta' perċentwali meta konċentrazzjonijiet sistemiċi minn studji dwar annimali jitqabblu ma' dejta analoga ta' monitoraġġ bijoloġiku minn studji dwar espożizzjoni ta' ħaddiema. Is-sitwazzjoni tista' ssir aktar kumplessa jekk dożi jkunu fil-firxa mhux lineari; għalhekk huwa importanti li tgħarbil tossikokinetiku jiddetermina dożi fil-firxa lineari.

Distribuzzjoni tat-Tessuti

37. Tagħrif dwar id-distribuzzjoni ta' tessuti ta' kimika għall-ittestjar u/jew il-metaboliti tagħha huwa important għall-identifikazzjoni ta' tessuti mmirati u biex wieħed jifhem il-mekkaniżmi bażiċi ta' tossiċità u tinkiseb informazzjoni dwar il-potenzjal għal akkumulazzjoni u persistenza ta' kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti. Il-perċentwali tad-doża totali (radjuattiva) f'tessuti kif ukoll ta' karkassa residwali għandhom mill-anqas jitkejlu fit-tmiem tal-esperiment ta' eskrezzjoni (eż. tipikament sa 7 ijiem wara doża jew anqas skont x'tagħmel speċifikatament kimika għall-ittestjar). Meta ma tinstab ebda kimika għall-ittestjar f'tessuti fi tmiem ta' studju (eż. minħabba li l-kimika għall-ittestjar setgħet kienet eliminata qabel intemm l-istudju minħabba nofs ħajja qasira), għandha tingħata attenzjoni biex ma jkunx hemm interpretazzjni ħażina tad-dejta. F'dan it-tip ta' sitwazzjoni, id-distribuzzjoni ta' tessuti għandha tkun investigata fil-mument tal-konċentrazzjoni massima tal-plażma/tad-demm tal-kimika għall-ittestjar (u/jew tal-metabolite) (T_{max}) jew tar-rata massima ta' eskrezzjoni tal-awrina, kif jixraq (ara l-paragrafu 38). Barra dan, il-ġbir ta' tessuti f'punti addizzjonali ta' ħin jista' jkun meħtieġ biex jiddetermina d-distribuzzjoni ta' tessuti tal-kimika għall-ittestjar u/jew tal-metaboliti tagħha, biex jevalwa d-dipendenza fuq il-ħin (fejn xieraq), biex jgħin biex ikun stabbilit bilanċ ta' massa u/jew skont kif ikun meħtieġ minn awtorità kompetenti. It-tessuti li għandhom jinġabru jinkludu l-fwied, ix-xaħam, is-sistema GI, il-kilwa, il-milsa, id-demm kollu, il-karkassa residwali, tessuti tal-organu mmirati u kwalunwke tessut ieħod (eż. tirojde, l-eritroċiti, l-organi ta' riproduzzjoni, il-ġidla, l-għajn (partikolarment f'annimali bix-xagħar) ta' sinifikanza potenzjali fl-evalwazzjoni tossikoloġika tal-kimika għall-ittestjar. L-analiżi ta' tessuti addizzjonali fl-istess punti ta' ħin għandha tiġi kkunsidrata għall-utilizzazzjoni massima tal-annimali u fil-każ li t-tossiċità tal-organu mmirat tiġi osservata fl-istudji tat-tossiċità subkronaka u kronaka. Il-konċentrazzjoni residwali (raju attiva) u l-proporzjonijiet ta' tessut-għal-plażma (demm) għandhom jiġu rreġistrati wkoll.

38. L-evalwazzjoni tad-distribuzzjoni ta' tessuti f'punti addizzjonali ta' ħin bħal fil-ħin ta' konċentrazzjoni massima ta' plażma/demm (eż. T_{max}) jew tar-rata massima ta' eskrezzjoni tal-awrina, miksuba mill-esperimenti rispettivi kineticì tal-plażma/demm jew ta' eskrezzjoni, tista' wkoll tkun meħtieġa jew mitluba minn awtorità kompetenti. Din l-informazzjoni tista' tkun utli biex wieħed jifhem it-tossiċità u l-potenzjal għal akkumulazzjoni u persistenza ta' kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti. Għandha tkun ipprovduta ġustifikazzjoni għal għażla ta' teħid ta' kampjuni; il-kampjuni għal analiżi ġeneralment għandhom ikunu l-istess bħal dawk ta' hawn fuq (ara l-paragrafu 37).

▼M4

39. Il-kwantifikazzjoni tar-radjuattività għal studji dwar distribuzzjoni ta' tessuti tista' ssir billi jintużaw dissezzjoni ta' organi, omoġenizzazzjoni, kombustjoni u/jew solubilizzazzjoni, segwiti bl-għadd ta' xintillazzjonijiet likwidi (LSC) ta' residwi maqbudin. Ċerti tekniki, li bħalissa jinsabu f'diversi stadji ta' żvilupp, eż. awtoradjografija kwantitattiva tal-ġisem kollu u awtoradjografija reċettriċi mikroskopika jistgħu jkunu utli biex tkun iddeterminata d-distribuzzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'organi u/jew f'tessuti (3) (4).

40. Għal rotot ta' espożizzjoni minbarra orali, għandhom jinġabru tessuti speċifiċi u jkunu analizzati, bħal pulmuni fi studji ta' inalazzjoni u ġilda fi studji dermali. Ara l-paragrafi 74-78.

Metaboliżmu

41. Eskreta (u plażma, kif jixraq) għandhom jinġabru għal identifikazzjoni u kwantifikazzjoni ta' kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti mhux mibdulin kif deskritt fil-paragrafi 44-49. Il-ġabra flimkien tal-eskreta biex tkun iffaċilitata l-identifikazzjoni ta' metaboliti fi grupp ta' doża partikolari huwa aċċettabbli. It-teħid ta' profil ta' metaboliti minn kull perjodu ta' żmien huwa rrakkomandat. Iżda, jekk nuqqas ta' kampjun u/jew radjuattività ma jħallux li jsir dan, il-ġmigħ ta' awrina u rawt f'diversi punti ta' ħin ikun aċċettabbli iżda l-ġmigħ fir-rigward tas-sessi jew tad-doži kollha ma jkunx aċċettabbli. Għandhom jintużaw metodi kwalitattivi u kwantitattivi biex ikunu analizzati awrina, rawt, radjuattività skaduta minn annimali ttrattati, u bili jekk ikun xieraq.

42. Għandhom isiru sforzi raġonevoli biex ikunu identifikati l-metaboliti kollha li jkun hemm f'5 % jew aktar tad-doża amministrata u biex tkun ipprovduta skema metabolika għall-kimika għall-ittestjar. Għandhom ikunu identifikati kimiċi għall-ittestjar li kienu kkaratterizzati fl-eskreta bħala li jikkomprendu 5 % jew aktar tad-doża amministrata. Identifikazzjoni tirreferi għad-determinazzjoni strutturali eżatta ta' komponenti. B'mod tipiku, identifikazzjoni tinkiseb jew b'kokromatografija tal-metabolite bi standards magħrufin billi jintużaw żewġ sistemi mhux bħal xulxin jew b'tekniki b'kapaċità għal identifikazzjoni strutturali pożittiva bħal spettrometrija tal-massa, reżonanza nukleari manjetika (NMR), eċċ. Fil-każ ta' kokromatografija, tekniki kromatografiċi li jutilizzaw l-istess fażi stazzjonarja b'żewġ sistemi differenti ta' solventi ma jitqisux li jkunu verifika adegwata ta' żewġ metodi ta' identità ta' metaboliti, minħabba li l-metodi ma jkunux indipendenti. Identifikazzjoni b'kokromatografija għandha tinkiseb billi jintużaw żewġ sistemi mhux bħal xulxin, analitikament indipendenti bħal kromatografija ta' saff irqiq ta' fażi kuntrarja u normali (TLC) u kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja (HPLC). Sakemm is-separazzjoni kromatografika tkun ta' kwalità adattata, f'dak il-każ ma tkunx meħtieġa konferma addizzjonali b'mezzi spettroskopiċi. Alternattivament, identifikazzjoni mhux ambigwa tista' tinkiseb billi jintużaw metodi li jipprovdu informazzjoni strutturali bħal: kromatografija likwida/spettrometrija tal-massa (LC-MS), jew kromatografija likwida/spettrometrija tal-massa tandem (LC-MS/MS), kromatografija tal-gass/spettrometrija tal-massa (GC-MS), u spettrometrija NMR.

43. Jekk ma tkunx tista' ssir identifikazzjoni ta' metaboliti f'5 % jew aktar tad-doża amministrata, għandha tingħata ġustifikazzjoni/spjegazzjoni fir-rapport finali. Jista' jkun xieraq li jkunu identifikati metaboliti li jkunu jirrappreżentaw anqas minn 5 % tad-doża amministrata biex jinkiseb għarfien aħjar tal-passaġġ metaboliku għall-valutazzjoni tal-periklu u/jew tar-riskju tal-kimika għall-ittestjar. Għandha tingħata konferma strutturali kull meta jkun possibbli. Din tista' tinkludi teħid ta' profili fil-plażma jew fid-demm jew f'tessuti oħra.

▼M4

Eskrezzjoni

44. Ir-rata u l-kwantità ta' eskrezzjoni tad-doża amministrata għandhom ikunu ddeterminati billi jitkejjel il-perċentwali ta' doża rkuprata (radjuattiva) mill-awrina, mir-rawt u mill-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra. Din id-dejta tgħin ukoll biex ikun stabbilit bilanċ ta' massa. Il-kwantitajiet ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) eliminati fl-awrina, fir-rawt u fl-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra għandhom ikunu ddeterminati f'intervalli ta' ħin adatti (ara l-paragrafi 47-49). Esperimenti ta' doża ripetuta għandhom jitfasslu sewwa biex jitħalla jkun hemm ġbir ta' dejta ta' eskrezzjoni biex jitħarsu l-għanijiet deskritti fil-paragrafu 26. Dan jippermetti li jkun hemm paragun ma' esperimenti ta' doża waħda.

45. Jekk studju pilota jkun wera li ma jkun ħareġ bħala eskreta fl-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra ebda ammont sinifikanti ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) (skont il-paragrafu 49), f'dak il-każ l-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra ma jkunx jeħtiġilha tinġabar fl-istudju definittiv.

46. Kull annimal għandu jitqiegħed f'unità metabolika separata għall-ġbir ta' eskreta (awrina, rawt u arja ta' teħid tan-nifs 'il barra). Fit-tmiem ta' kull perjodu ta' ġbir (ara l-paragrafi 47-49), l-unitajiet metaboliċi għandhom jitlaħalħu b'solvent adattat (dan huwa magħruf bħala "ħasil tal-gaġġa") biex ikun żgurat irkupru massimu tal-kimika għall-ittestjar (radjuattività). Il-ġbir ta' eskreta għandu jintemm wara 7 ijiem, jew wara li mill-anqas 90 % tad-doża amministrata tkun ġiet irkuprata, skont liema minnhom jiġi l-ewwel.

47. Il-kwantitajiet totali ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) fl-awrina għandhom ikunu ddeterminati f'mill-anqas żewġ punti ta' ħin fl-ewwel jum tal-ġbir, li wieħed minnhom għandu jkun f'24 siegħa wara d-dożaġġ, u kuljum minn hemm 'il quddiem sakemm jintemm l-istudju. Ix-xewqa hija li l-għażla tkun ta' aktar minn żewġ punti ta' teħid ta' kampjuni fl-ewwel jum (eż. fis-6, fit-12 u fl-24 siegħa). Ir-riżultati ta' studji pilota għandhom ikunu analizzati għal informazzjoni dwar punti ta' ħin alternattivi jew addizzjonali biex isir il-ġbir. Għandu jkun ipprovdut motiv għal skedi ta' ġbir.

48. Il-kwantitajiet totali ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) f'rawt għandhom ikunu ddeterminati fuq bażi ta' kull jum li tibda fl-24 siegħa wara d-dożaġġ sakemm jintemm l-istudju, jekk studji pilota ma jissuġġerux punti ta' ħin alternattivi jew addizzjonali għal ġbir. Għandu jkun ipprovdut motiv għal skedi ta' ġbir alternattivi.

49. Il-ġbir ta' CO_2 skadut u ta' materjali volatili oħra jista' jitwaqqaf f'esperiment ta' studju partikolari meta anqas minn 1 % tad-doża amministrata tinstab fl-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra matul perjodu ta' ġbir ta' 24 siegħa.

Studji ta' Perkors ta' Żmien

Kinetika ta' Plażma/Demm

50. Il-fini ta' dawn l-istudji huwa li jinkisbu stimi ta' parametri bażiċi ta' TK [eż. nofs ħajja C_{max}, $T_{max,}$ ($t_{1/2}$), AUC] għall-kimika għall-ittestjar. Dawn l-istudji jistgħu jsiru b'doża waħda jew, x'aktarx, b'żewġ dożi jew aktar. Id-dożi għandhom ikunu stabbiliti skont kif ikunu ddeterminati min-natura tal-esperiment u/jew skont il-kwistjoni li tkun qed tiġi indirizzata. Tista' tkun meħtieġa dejta kinetika biex ikunu solvuti kwistjonijiet bħad-disponibbiltà bijoloġika tal-kimika għall-ittestjar u/jew biex ikun iċċarat l-effett ta' doża fuq ikklirjar (eż. biex ikun iċċarat jekk ikklirjar ikunx issaturat b'mod li jkun jiddependi minn doża).

51. Għal dawn l-istudji għandu jintuża mhux anqas minn erba' annimali ta' sess wieħed għal kull grupp ta' doża. Għandha tingħata ġustifikazzjoni għas-sess tal-annimali użat. Għandu jitqies l-użu taż-żewġ sessi (erba' rġiel u erba' nisa) jekk ikun hemm evidenza li ssostni differenzi sustanzjali fit-tossiċità b'rabta mas-sessi.

▼M4

52. Wara li tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar (b'tikketta radjoloġika), għandhom jinkisbu kampjuni tad-demm minn kull annimal f'punti adatti ta' ħin bl-użu ta' metodoloġija xierqa ta' teħid ta' kampjuni. Il-volum u l-għadd ta' kampjuni tad-demm li jistgħu jinkisbu minn kull annimal jistgħu jkunu llimitati minn effetti potenzjali ta' teħid ripetut ta' kampjuni fuq is-saħħa/il-fiżjoloġija u/jew fuq is-sensittività tal-metodu analitiku. Kampjuni għandhom ikunu analizzati għal kull annimal għalih waħdu. F'xi ċirkostanzi (eż. karatterizzazzjoni ta' metaboliti), jista' jkun meħtieġ li jingħemgħu kampjuni minn aktar minn annimal wieħed. Kampjuni miġmugħin għandhom ikunu identifikati b'mod ċar u għandha tingħata spjegazzjoni għall-ġabra flimkien. Jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika, analiżi tar-radjuattività totali li jkun hemm tista' tkun adegwata. Jekk ikun hekk, radjuattività totali għandha tkun analizzata fid-demm u fil-plażma kollha jew fil-plażma u fiċ-ċelluli ħomor tad-demm biex titħalla ssir kalkulazzjoni tal-proporzjon ta' demm/plażma. F'ċirkostanzi oħra jistgħu jkunu meħtieġa investigazzjonijiet aktar speċifiċi li jkunu jeħtieġu l-identifikazzjoni ta' kompost u/jew ta' metaboliti prinċipali, jew ikun meħtieġ li jkun ivvalutat it-tgħaqqid ta' proteini.

Tessuti Kinetiċi Oħra

53. L-għan ta' dawn l-istudji huwa li tinkiseb informazzjoni dwar il-perkors ta' żmien biex ikunu indirizzati affarijiet relatati ma' kwistjonijiet bħal modalità tossika ta' azzjoni, akkumulazzjoni bijoloġika u persistenza bijoloġika permezz ta' determinazzjoni ta' livelli ta' kimika għall-ittestjar f'diversi tessuti. L-għażla ta' tessuti u l-għadd ta' punti ta' ħin evalwati jkunu jiddependu mill-kwistjoni li jkollha tkun indirizzata u mid-database tossikoloġika għall-kimika għall-ittestjar. It-tifsila ta' dawn l-istudji addizzjonali ta' tessuti kinetiċi għandha tqis informazzjoni miġbura kif deskritt fil-paragrafi 37-40. Dawn l-istudji jistgħu jinvolvu dożaġġ wieħed jew ripetut. Għandu jkun ipprovdut motiv dettaljat għall-approċċ użat.

54. Raġunijiet biex isiru studji oħra dwar tessuti kinetiċi jistgħu jinkludu:

— Evidenza ta' nofs ħajja tad-demm estiża, li tindika li jista' jkun hemm akkumulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'diversi tessuti jew

— interess li wieħed jara jekk ikunx inkiseb livell ta' stat regolari f'tessuti speċifiċi (eż. fi studji dwar dożaġġ ripetut; ukoll jekk ikun jidher li nkiseb livell ta' demm fi stat regolari ta' kimika għall-ittestjar, jista' jkun hemm interess li jkun aċċertat li jkun intlaħaq livell ta' stat regolari f'tessuti mmirati).

55. Għal dawn it-tipi ta' studji dwar perkors ta' żmien, għandha tkun amministrata doża orali xierqa ta' kimika għall-ittestjar lil mhux anqas minn erba' annimali għal kull doża għal kull punt ta' ħin, u l-perkors ta' żmien ta' distribuzzjoni jkun immonitorjat f'tessuti magħżulin. Jista' jintuża sess wieħed biss, sakemm ma tkunx osservata tossiċità speċifika għall-ġeneru. Jekk ikunux analizzati radjuattività totali jew kimika u/jew metaboliti prinċipali jkun jiddependi wkoll mit-tessut li jkun qed jiġi eżaminat. Għandha ssir valutazzjoni ta' distribuzzjoni ta' tessuti bl-użu ta' tekniki adatti.

Induzzjoni/Inibizzjoni ta' Enzimi

56. Studji li jindirizzaw l-effetti li jista' jkun hemm ta' induzzjoni/inibizzjoni ta' enzimi jew ta' trasformazzjoni bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar li tkun qed tiġi studjata jistgħu jkunu meħtieġa f'każ wieħed jew aktar li ġejjin:

1. L-evidenza li jkun hemm tkun tindika relazzjoni bejn trasformazzjoni bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar u tossiċità msaħħa;

2. Id-dejta li jkun hemm dwar tossiċità tkun tindika relazzjoni mhux lineari bejn doża u metaboliżmu;

▼M4

3. Ir-riżultati ta' studji dwar identifikazzjoni ta' metaboliti juru identifikazzjoni ta' metabolite li tista' tkun tossika li setgħet kienet prodotta minn passaġġ ta' enzima miġjuba mill-kimika għall-ittestjar;

4. Fi spjegazzjoni ta' effetti li jkun ippostulat li jkollhom rabta ma' fenomini ta' induzzjoni ta' enzimi;

5. Jekk ikunu osservati tibdiliet tossikoloġiċi sinifikanti fil-profil metaboliku tal-kimika għall-ittestjar permezz ta' esperimenti in vitro jew in vivo fi speċijiet jew f'kundizzjonijiet differenti, tista' tkun meħtieġa karatterizzazzjoni tal-enzima/i involuta/i (eż. enzimi tal-Fażi I bħal isoenzimi tas-sistema ta' ossiġenaži mono li jkunu jiddependu minn Ċitokromju P450, enzimi tal-Fażi II bħal isoenzimi ta' sulfotransferaži jew glucuronosyl trasferimentaži ta' difosfat tal-uridina jew kull enzima rilevanti oħra). Din l-informazzjoni tista' tintuża biex tkun evalwata l-pertinenza ta' estrapolazzjonijiet minn speċi għal speċi.

57. Għandhom jintużaw protokolli xierqa ta' studji biex tkun evalwata kimika għall-ittestjar relatata ma' bidliet f'TK, ivvalidati u ġġustifikati bħala tajbin. Eżempji ta' tifsiliet ta' studji jikkonsistu f'dożaġġ ripetut b'kimika għall-ittestjar mingħajr tikketta, segwiti b'doża waħda b'tikketta radjoloġika fl-14-il jum, jew b'dożaġġ ripetut b'kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika u b'teħid ta' kampjuni fl-1, fis-7 u fl-14-il jum għal determinazzjoni ta' profili ta' metaboliti. Dożaġġ ripetut b'kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika jista' wkoll jipprovdi informazzjoni dwar akkumulazzjoni bijoloġika (ara l-paragrafu 26).

APPROĊĊI SUPPLIMENTARI

58. Approċċi supplimentari lil hinn mill-esperimenti in vivo deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar jistgħu jipprovdu informazzjoni utli dwar l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu jew l-eliminazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'ċerti speċijiet.

Użu ta' informazzjoni *in vitro*

59. Jistgħu jkunu indirizzati diversi mistoqsijiet dwar il-metaboliżmu tal-kimika għall-ittestjar fi studji *in vitro* billi jintużaw sistemi ta' ttestjar adatti. Jistgħu jintużaw epatoċiti li jkunu għadhom kif ġew iżolati jew li kienu f'kultura u frazzjonijiet subċellulari (eż. mikrożomi u ċitosoli jew frazzjoni S9) mill-fwied biex ikunu studjati metaboliti li jista' jkun hemm. Metaboliżmu lokali fl-organu mmirat, eż. il-pulmun, jista' jkun ta' interess għall-valutazzjoni tar-riskju. Għal dawn l-għanijiet, frazzjonijiet mikrosomali ta' tessuti mmirati jistgħu jkunu utli. Studji dwar mikrożomi jistgħu jkunu utli biex ikunu indirizzati differenzi potenzjali dwar ġeneru u stadji tal-ħajja u biex ikunu kkaratterizzati parametri ta' enzimi (K_m u V_{max}) li jistgħu jkunu ta' għajnuna fil-valutazzjoni ta' dipendenza fuq doża ta' metaboliżmu b'rabta ma' livell ta' konċentrazzjoni. Flimkien ma' dan, mikrożomi jistgħu jkunu utli biex ikunu identifikati l-enżimi mikrosomali speċifiċi involuti fil-metaboliżmu tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jkunu rilevanti f'estrapolazzjoni ta' speċijiet (ara wkoll il-paragrafu 56). Il-potenzjal għal induzzjoni ta' trasformazzjoni bijoloġika jista' wkoll ikun eżaminat billi jintużaw frazzjonijiet subċellulari tal-fwied (eż. mikrożomi u ċitosoli) tal-annimali ttrattati minn qabel bil-kimika għall-ittestjar ta' interess, *in vitro* permezz ta' studji dwar induzzjoni ta' epatoċite jew minn linji speċifiċi ta' ċelluli li jkunu jesprimu enzimi rilevanti. F'ċerti ċirkostanzi u f'kundizzjonijiet xierqa, frazzjonijiet subċellulari li jkunu ġejjin minn tessuti tal-bniedem jistgħu jitqiesu biex jintużaw biex ikunu ddeterminati differenzi li jista' jkun hemm ta' speċijiet fi trasformazzjoni bijoloġika. Ir-riżultati minn investigazzjonijiet *in vitro* jistgħu wkoll ikunu utli fl-iżvilupp ta' mudelli PBTK (5).

▼M4

60. Studji ta' assorbiment dermali *in vitro* jistgħu jipprovdu informazzjoni supplimentari biex ikun ikkaratterizzat assorbiment (6).

61. Kulturi ta' ċelluli primarji minn ċelluli tal-fwied u ftieti friski ta' tessuti jistgħu jintużaw biex ikunu indirizzati mistoqsijiet simili dwar mikrożomi tal-fwied. F'ċerti każijiet, jista' jkun possibbli jitwieġbu mistoqsijiet speċifiċi billi jintużaw linji ta' ċelluli b'espressjoni definita tal-enzima rilevanti jew b'linji ta' ċelluli maħdumin. F'certi każijiet, jista' jkun utli li jkunu studjati l-inibizzjoni u l-induzzjoni ta' isożimi speċifiċi ta' ċitokromju P450 (eż. CYP1A1, 2E1, 1A2 u oħrajn) u/jew enżimi tal-Faži II mill-kompost prinċipali billi jintużaw studji *in vitro*. Informazzjoni miksuba tista' tkun utli għal komposti strutturati bl-istess mod.

Użu ta' Dejta Tossikokinetika minn Studji dwar Tossiċità bħala Informazzjoni Komplimentari

62. Analiżi ta' kampjuni ta' demm, tessuti u/jew eskreta miksubin meta jkun qed isir kull studju ieħor dwar tossiċità tista' tipprovdi dejta dwar disponibbiltà bijoloġika, bidliet f'konċentrazzjoni ta' plażma f'waqtha (AUC, C_{max}), potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika, rati ta' kklirjar u tibdiliet fil-ġeneru jew fi stadji tal-ħajja fil-metaboliżmu u fil-kinetika.

63. Konsiderazzjoni tat-tifsila tal-istudju tista' tintuża biex jitwieġbu mistoqsijiet relatati ma': saturazzjoni ta' assorbiment, trasformazzjoni bijoloġika jew passaġġi ta' eskrezzjoni f'livelli ta' doži oġħla; it-tħaddim ta' passaġġi metaboliċi ġodda f'doži oġħla u l-limitazzjoni ta' metaboliti tossiċi għal doži oġħla.

64. Konsiderazzjonijiet oħra dwar valutazzjoni tal-periklu jistgħu jinkludu kwistjonijiet bħal:

— Sensittività relatata mal-età minħabba differenzi fl-istatus tal-limitu bejn demm u moħħ, kilwa u/jew kapaċitajiet ta' diżintossifikazzjoni;

— Sensittività ta' subpopolazzjoni minħabba differenzi f'kapaċitajiet ta' trasformazzjoni bijoloġika jew differenzi oħra ta' TK;

— Kemm tkun l-espożizzjoni tal-fetu minn trasferiment ta' kimiċi mill-plaċenta jew tal-wild ġdid mill-irdigħ.

Użu ta' Mudellar Tossikokinetiku

65. Mudelli tossikokinetiċi jistgħu jkunu utli għal diversi aspetti ta' valutazzjoni tal-periklu u tar-riskju bħal, pereżempju fit-tbassir ta' espożizzjoni sistemika u ta' doża għal tessuti interni. Barra dan, jistgħu jkunu indirizzati mistoqsijiet dwar modalità ta' azzjoni, u dawk il-mudelli jistgħu jipprovdu bażi għal estrapolazzjoni ma' speċijiet, rotot ta' espożizzjoni, xejriet ta' dożaġġ, u għal valutazzjoni tar-riskju għal bniedem. Dejta utli biex ikunu żviluppati mudelli ta' PBTK għal kimika għall-ittestjar f'kull speċi partikolari jinkludu 1) koeffiċjenti ta' partizzjoni, 2) kostanti ta' kimika bijoloġika u parametri fiżjoloġiċi, 3) parametri ta' assorbiment speċifiċi għal rotta u 4) dejta kineta *in vivo* għal evalwazzjoni ta' mudelli [eż. parametri ta' kklirjar għal passaġġi ta' eskrezzjoni (> 10 %), K_m u V_{max} għal metaboliżmu]. Id-dejta ta' esperimenti użata fi żvilupp ta' mudelli għandha tkun iġġenerata b'metodi xjentifikament tajbin, u r-riżultati tal-mudelli għandhom ikunu vvalidati. Parametri speċifiċi għal kimiċi u għal speċijiet bħal rati ta' assorbiment, partizzjoni ta' tessuti tad-demm u kostanti ta' rati metaboliċi sikwit ikunu ddeterminati biex jiffaċilitaw żvilupp ta' mudelli mhux kompartimentali jew mudelli b'bażi fiżjoloġika (7).

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

66. Huwa rrakkomandat li r-rapport tal-istudju jkun jinkludi werrej.

Korp tar-Rapport

67. Il-korp tar-rapport għandu jinkludi informazzjoni koperta minn dan il-Metodu ta' Ttestjar organizzata f'taqsimiet u paragrafi kif ġej:

Sommarju

68. Din it-taqsima tar-rapport tal-istudju għandha tinkludi sommarju tat-tifsila tal-istudju u deskrizzjoni ta' metodi użati. Għandha tagħti wkoll prominenza lis-sejbiet ewlenin dwar bilanċ ta' massa, in-natura u l-kobor tal-metaboliti, residwu ta' tessuti, rata ta' kklirjar, potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika, differenzi sesswali, eċċ. Is-sommarju għandu jkun ippreżentat b'dettalji suffiċjenti biex titħalla ssir evalwazzjoni tas-sejbiet.

Daħla

69. Din it-taqsima tar-rapport għandha tinkludi l-għanijiet tal-istudju, il-motiv u t-tifsila, kif ukoll referenzi adatti u informazzjoni storika bħala sfond.

Materjali u Metodi

70. Din it-taqsima tar-rapport għandha tinkludi deskrizzjonijiet dettaljati tal-informazzjoni kollha pertinenti, inklużi:

(a) Kimika għall-Ittestjar

Din is-subtaqsima għandha tinkludi identifikazzjoni tal-kimika għall-ittestjar: l-isem tal-kimika, l-istruttura molekulari, id-determinazzjoni kwalitattiva u kwantitattiva tal-kompożizzjoni kimika tagħha, il-purezza kimika u kull meta jkun possibbli, it-tip u l-kwantitajiet ta' kull impurezza. Għandha tinkludi wkoll informazzjoni dwar proprjetajiet fiżiċi/kimiċi, inkluż l-istat fiżiku, lewn, solubilità gross u/jew koeffiċjent tal-partizzjoni, stabbiltà, u fejn xieraq, korrużività. Jekk tkun applikabbli, għandha tingħata informazzjoni dwar isomeri. Jekk il-kimika għall-ittestjar tkun b'tikketta radjoloġika, f'din is-subtaqsima għandha tkun inkluża informazzjoni dwar dan li ġej: it-tip ta' radjonuklid, il-pożizzjoni tat-tikketta, attività speċifika u purezza radjukimika.

Għandhom ikunu ddikjarati t-tip jew id-deskrizzjoni ta' kull vejjikolu, dilwent, aġent ta' sospensjoni u emulsifikatur jew materjal ieħor użati biex tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar.

(b) Annimali tat-Test

Din is-subtaqsima għandha tinkludi informazzjoni dwar l-annimali tat-test, inklużi għażla u ġustifikazzjoni għal speċi, razza u età meta jibda l-istudju, sess, kif ukoll piż tal-ġisem, stat ta' saħħa u trobbija tal-annimali.

(c) Metodi

Din is-subtaqsima għandha tinkludi dettalji tat-tifsila tal-istudju u l-metodoloġija użata. Għandha tinkludi deskrizzjoni ta':

(1) Ġustifikazzjoni għal kull modifika ta' rotta ta' espożizzjoni u kundizzjonijiet ta' espożizzjoni, jekk applikabbli;

▼M4

(2) Ġustifikazzjoni għal għażla ta' livelli ta' doża;

(3) Deskrizzjoni ta' studji pilota użati fit-tifsila sperimentali tal-istudji ta' segwitu, jekk applikabbli. Għandha tkun sottomessa dejta ta' sostenn tal-istudju pilota;

(4) Kif tkun tħejjiet is-soluzzjoni tad-dożaġġ u t-tip ta' solvent jew vejjikolu użat, jekk ikun hemm;

(5) Għadd ta' gruppi ta' trattament u għadd ta' annimali għal kull grupp;

(6) Livelli ta' dożaġġ u volum (u attività speċifika tad-doża meta tintuża r-radjuattività);

(7) Rotta/rotot u metodi ta' amministrazzjoni;

(8) Frekwenza ta' dożaġġ;

(9) Perjodu ta' sawm (jekk użat);

(10) Radjuattività totali għal kull annimal;

(11) Maniġġar tal-annimali;

(12) Ġbir u maniġġar ta' kampjuni;

(13) Metodi analitiċi użati għal separazzjoni, kwantifikazzjoni u identifikazzjoni ta' metaboliti;

(14) Limitu ta' detezzjoni għall-metodi użati;

(15) Il-kejlijiet u proċeduri sperimentali oħra użati (inkluża validazzjoni ta' metodi għal analiżi ta' metaboliti).

(d) Analiżi ta' Statistika

Jekk tintuża analiżi ta' statistika biex ikunu analizzati s-sejbiet tal-istudju, f'dak il-każ għandha tkun inkluża informazzjoni suffiċjenti dwar il-metodu ta' analiżi u l-programm tal-kompjuter użat, biex reviżur/statistiku indipendenti jkun jista' jevalwa mill-ġdid u jibni mill-ġdid l-analiżi.

Fil-każ ta' studji ta' mudellar ta' sistemi bħal PBTK, il-preżentazzjoni ta' mudelli għandha tinkludi deskrizzjoni sħiħa tal-mudell biex jitħallew isiru rikostruzzjoni u validazzjoni indipendenti tal-mudell (ara l-paragrafu 65 u l-Appendiċi: Definizzjonijiet).

Riżultati

71. Id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor u tiġi ttabulata b'evalwazzjoni xierqa ta' statistika u deskritta fit-test ta' din it-taqsima. Dejta ta' radjuattività magħduda għandha tinġabar fil-qosor u tkun ippreżentata kif jixraq għall-istudju, tipikament bħala ekwivalenti ta' mikrogrammi jew milligrammi għal kull massa ta' kampjun, għalkemm ikunu jistgħu jintużaw unitajiet oħra. Din it-taqsima għandha tinkludi illustrazzjonijiet grafiċi tas-sejbiet, riproduzzjoni ta' dejta kromatografika u spettrometrika rappreżentattiva, identifikazzjoni ta' metaboliti/kwantifikazzjoni u passaġġi metaboliċi proposti, inkluża struttura molekulari ta' metaboliti. Flimkien ma' dan, f'din it-taqsima għandha tkun inkluża l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun tapplika:

(1) Kwantità u perċentwali ta' rkupru ta' radjuattività fl-awrina, rawt, arja ta' teħid tan-nifs 'il barra, u ħasil tal-gaġeġ mill-awrina u r-rawt.

— Għal studji dermali, inkludi wkoll dejta dwar irkupru ta' kimika għall-ittestjar minn ġilda ttrattata, minn ħasil ta' ġlud u minn radjuattività residwali fl-apparat li jgħatti l-ġilda u mill-unità metabolika, u inkludi wkoll riżultati tal-istudju dwar ħasil dermali. Għal aktar diskussjoni, ara l-paragrafi 74-77.

▼M4

— Għal studji ta’ inalazzjoni, inkludi wkoll dejta dwar irkupru ta’ kimika għall-ittestjar minn pulmuni u tessuti nażali (8). Għal aktar diskussjoni, ara l-paragrafu 78.

(2) Id-distribuzzjoni ta’ tessuti tkun irrappurtata bħala perċentwali tad-doża amministrata u tal-konċentrazzjoni (ekwivalenti ta’ mikrogrammi għal kull gramma ta’ tessuti), u proporzjonijiet ta’ tessut ma’ demm u ta’ tessut ma’ plażma;

(3) Bilanċ ta’ materjali żviluppat minn kull studju li jinvolvi l-analiżi ta’ tessuti tal-ġisem u eskreta;

(4) Konċentrazzjonijiet ta’ plażma u parametri tossikokinetiċi (disponibbiltà bijoloġika, AUC, Cmax, Tmax, ikklirjar, nofs ħajja) wara amministrazzjoni mir-rotta/rotot rilevanti ta’ espożizzjoni;

(5) Rata u ammont ta’ assorbiment tal-kimika għall-ittestjar wara amministrazzjoni mir-rotta/rotot ta’ espożizzjoni;

(6) Kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar u ta’ metaboliti (irrapportati bħala perċentwali tad-doża amministrata) miġburin fl-eskreta;

(7) Referenza għal dejta fl-appendiċi li jkun fiha dejta dwar annimali individwalment għall-punti kollha ta’ tmiem ta’ kejlijiet (eż. amministrazzjoni ta’ doża, rkupru ta’ perċentwali, konċentrazzjonijiet, parametri ta’ TK, eċċ);

(8) Figura bil-passaġġi metaboliċi proposti u l-istrutturi molekulari tal-metaboliti.

Diskussjoni u Konlużjonijiet

72. F’din it-taqsima l-awtur għandu:

(1) Jipprovdi passaġġ metaboliku propost ibbażat fuq ir-riżultati tal-metaboliżmu u fuq id-dispożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

(2) Jiddiskuti kull speċi u differenzi sesswali potenzjali dwar id-dispożizzjoni u/jew trasformazzjoni bijoloġika tal-kimika għall-ittestjar;

(3) Jittabula u jiddiskuti l-identifikazzjoni u l-kobor tal-metaboliti, ir-rati ta’ kklirjar, il-potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika u l-livell ta’ residwi ta’ tessuti ta’ ġenitur u/jew metabolite/i), kif ukoll bidliet, jekk ikun hemm, dipendenti minn doża f’parametri ta’ TK, kif ikun jixraq;

(4) Jintegra f’din it-taqsima kull dejta ta’ TK rilevanti miksuba waqt li kienu qed isiru studji dwar tossiċità;

(5) Jipprovdi konklużjoni qasira li s-sejbiet tal-istudju jkunu jistgħu jsostnuha;

(6) Iżid it-Taqsimiet (skont il-ħtieġa jew kif ikun jixraq).

73. Taqsimiet addizzjonali għandhom jintużaw biex tiddaħħal informazzjoni bibliografika ta’ sostenn, tabelli, figuri, appendiċijiet, eċċ.

▼**M4**

ROTOT ALTERNATTIVI TA' ESPOŻIZZJONI

Dermali

Trattament Dermali

74. Din it-taqsima tipprovdi informazzjoni speċifika dwar investigazzjoni tas-tossikokinetika tal-kimika għall-ittestjar bir-rotta dermali. Għall-assorbiment dermal, għandu jiġi kkonsutat l-kapitolu B.44 ta' dan l-Anness [Assorbiment tal-ġilda: il-metodu *in vivo* (9)]. Għal punti ta' tmiem oħra bħal distribuzzjoni u metaboliżmu, jista' jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar B.36. Għandu jintuża livell wieħed jew aktar ta' doża għall-kimika għall-ittestjar fit-trattament dermali. Il-kimika għall-ittestjar (eż. pura, dilwita jew materjal ifformulat li jkun fih il-kimika għall-ittestjar li tkun applikata fuq il-ġilda) għandha tkun l-istess (jew sostitut realistiku) bħal dik li għaliha l-bnedmin jew speċi potenzjali oħra mmirata jistgħu jkunu esposti. Il-livell ta' doża għandu jintgħażel skont il-paragrafi 20-26 ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar. Fatturi li jistgħu jitqiesu għal għażla ta' doża dermali jinkludu espożizzjoni mistennija mill-bniedem u/jew dożi li fihom tkun ġiet osservata tossiċità fi studji oħra dermali dwar tossiċità. Id-doża dermali għandha tinħall, jekk ikun meħtieġ, f'vejjikolu adattat u tkun applikata f'volum adegwat biex iwassal id-dożi. Ftit qabel l-ittestjar, il-pil għandu jitqasqas mill-erja dorsali tat-tronk tal-annimali tat-test. Jista' jintuża t-taqxir, iżda dan għandu jsir madwar 24 siegħa qabel it-test. Meta l-pil ikun qed jitqasqas jew jitqaxxar, wieħed għandu joqgħod attent biex jevita li jisloħ il-ġilda, ħaġa li tista' tibdel l-permeabbiltà tagħha. Madwar 10 % tal-wiċċ tal-ġisem għandu jitneħħielu kollox minn fuqu biex tkun applikata l-kimika għall-ittestjar. Għal kimiċi tossiċi ħafna, l-erja tal-wiċċ koperta tista' tkun anqas minn madwar 10 %, iżda kemm jista' jkun ħafna mill-erja għandha tkun koperta b'rita rqiqa u uniformi. L-istess erja tal-wiċċ tat-trattament għandha tintuża għall-gruppi tat-testijiet dermali kollha. L-erjas li tkun ingħatat-hilhom doża għandhom jitħarsu b'kopertura adattata li tinżamm ferma f'postha. L-annimali għandhom jitqiegħdu f'posthom individwalment.

75. Għandu jsir studju dwar ħasil dermali biex ikun ivvalutat l-ammont tad-doża applikata tal-kimika għall-ittestjar li jkun jista' jitneħħa mill-ġilda billi l-erja tal-ġilda ttrattata tinħasel b'sapun ħafif u ilma. Dan l-istudju jista' jgħin ukoll biex ikun stabbilit bilanċ ta' massa meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata bir-rotta dermali. Għal dan l-istudju ta' ħasil dermali għandha tkun applikata doża waħda tal-kimika għall-ittestjar lil żewġ annimali. L-għażla tal-livell tad-doża jkun skont il-paragrafu 23 ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar (ara wkoll il-paragrafu 76 għal diskussjoni dwar ħin ta' kuntatt mal-ġilda). L-ammonti ta' kimika għall-ittestjar irkuprati waqt il-ħasil għandhom ikunu ddeterminati biex tkun ivvalutata l-effikaċja tat-tneħħija tal-kimika għall-ittestjar bil-proċedura tal-ħasil.

76. Sakemm ma tkunx tista' ssir minħabba l-possibbiltà ta' korrużjoni, il-kimika għall-ittestjar għandha tkun applikata u tinżamm fuq il-ġilda għal minimu ta' 6 sigħat. Meta tkun ser titneħħa l-kopertura, l-erja ttrattata għandha tinħasel skont il-proċedura li l-profil tagħha jinsab fl-istudju dwar il-ħasil dermali (ara l-paragrafu 75). Kemm il-kopertura kif ukoll il-ħasil għandhom ikunu analizzati għall-kimika għall-ittestjar residwali. Meta jintemmu l-istudji, kull annimal għandu jinqatel b'mod uman skont (2), u l-ġilda ttrattata titneħħa. Parti adattata mill-ġilda ttrattata għandha tkun analizzata biex tkun iddeterminata l-kimika għall-ittestjar residwali (radjuattività).

77. Għall-valutazzjoni tossikokinetika ta' farmaċewtiċi jistgħu jkunu meħtieġa proċeduri different, skont is-sistema regolatorja xierqa.

▼M4

Inalazzjoni

78. Għandha tintuża konċentrazzjoni waħda (jew aktar jekk ikun meħtieġ) ta' kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni għandha tintgħażel skont il-paragrafi 20-26 ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar. Trattamenti ta' inalazzjoni għandhom isiru billi jintuża apparat għal "kon tal-imnieħer" jew għal "ras biss" biex ma jitħalliex ikun hemm assorbiment minn rotot ta' espożizzjoni alternati (8). Jekk jintużaw kundizzjonijiet oħra ta' espożizzjoni ta' inalazzjoni, il-ġustifikazzjoni għall-modifika għandha tkun iddokumentata. Id-durata ta' espożizzjoni b'inalazzjoni għandha tkun iddefinita; espożizzjoni tipika ddum bejn 4 u 6 sigħat.

LETTERATURA:

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Il-Kapitolu B.45 ta' dan l-Anness: Assorbiment mill-Ġilda: Metodu In Vitro.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Il-Kapitolu B.44 ta' dan l-Anness: Assorbiment mill-Ġilda: Metodu In Vivo.

(10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Assorbiment: Proċess(i) ta' użu ta' kimiċi fi u madwar it-tessuti. Assorbiment jirreferi għall-kompost prinċipali u l-metaboliti kollha tiegħu. Ma għandux ikun konfuż ma' "disponibbiltà bijoloġika".

Akkumulazzjoni (Akkumulazzjoni bijoloġika): Żieda fl-ammont ta' kimika għall-ittestjar tul iż-żmien f'tessuti (is-soltu tessuti xaħmin, wara espożizzjoni ripetuta); jekk it-teħid ta' kimika għall-ittestjar fil-ġisem ikun akbar mir-rata li biha titneħħa, l-organiżmu jakkumula l-kimika għall-ittestjar u jistgħu jseħħu konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar. Akkumulazzjoni bijoloġika:

ADME: Akronimu għal "Assorbiment, Distribuzzjoni, Metaboliżmu, u Eskreta".

AUC: (Erja taħt il-kurva tal-plażma ta' konċentrazzjoni-ħin): Erja taħt il-kurva f'parti ta' konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fil-plażma tul iż-żmien. Tirrappreżenta l-ammont totali ta' kimika għall-ittestjar assorbit mill-ġisem f'perjodu predeterminat ta' żmien. F'kundizzjonijiet lineari, l-AUC (minn ħin żero sal-infinità) tkun proporzjonali għall-ammont totali ta' kimika għall-ittestjar assorbita mill-ġisem, irrispettivament mir-rata ta' assorbiment.

Awtoradjografija: (Awtoradjografija tal-ġisem kollu): Użata biex ikun iddeterminat b'mod kwalitattiv u/jew kwantitattiv fejn ikunu jinsabu tessuti ta' kimika għall-ittestjar radjuattiva, din it-teknika tuża film ta' raġġi-X jew aktar reċenti immaġnijiet fosforizzati diġitali biex tagħmel jidhru molekuli jew bċejjeċ ta' molekuli b'tikketta radjuattiva billi tirreġistra r-radjazzjoni maħruġa fl-oġġett studjat. Awtoradjografija kwantitattiva tal-ġisem kollu, mqabbla ma' dissezzjoni ta' organi, jista' jkollha xi vantaġġi għall-evalwazzjoni tad-distribuzzjoni ta' kimika għall-ittestjar u għall-valutazzjoni ta' rkupru globali u r-riżoluzzjoni ta' materjali radjuattivi f'tessuti. Vantaġġ wieħed sinifikanti, pereżempju, huwa li tista' tintuża f'mudell ta' annimal bix-xagħar biex ikun ivvalutat jekk jistax ikun hemm assoċjazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ma' melanin, li jista' jgħaqqad ċerti molekuli. Iżda, filwaqt li tista' tipprovdi b'mod konvenjenti prospetti tal-ġisem kollu tas-siti ta' tgħaqqid ta' kapaċità għolja u affinità baxxa, din it-teknika tista' tkun limitata biex jintgħarrfu siti mmirati speċifiċi bħal siti li jgħaqqdu reċetturi fejn ikunu meħtieġa relattivament riżoluzzjoni għolja u sensittività għolja għal detezzjoni. Meta tintuża awtoradjografija, esperimenti maħsubin biex jiddeterminaw bilanċ ta' massa ta' kompost amministrat għandhom isiru bħala grupp separat jew fi studju separat mill-esperiment ta' distribuzzjoni ta' tessuti, fejn l-eskreta kollha (li tista' tinkludi wkoll arja meħuda 'l barra man-nifs) u karkassi sħaħ ikunu omoġenizzati u analizzati billi jingħaddu b'xintillazzjoni likwida.

Eskrazzjoni ta' bili: Eskrezzjoni mill-kanal tal-bili

Akkumulazzjoni bijoloġika: Ara "Akkumulazzjoni".

Disponibbiltà bijoloġika: Frazzjoni ta' doża amministrata li tilħaq iċ-ċirkolazzjoni sistemika jew li tkun disponibbli fis-sit ta' attività fiżjoloġika. Normalment, disponibbiltà bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar tirreferi għall-kompost prinċipali, iżda tista' tirreferi għall-metabolite tagħha. Tqis biss forma waħda ta' kimika. *Nota Bene:* disponibbiltà bijoloġika u assorbiment mhumiex l-istess. Jista' jkun hemm differenza bejn eż. assorbiment orali (jiġifieri preżenza fil-ħajt tal-musrana u fiċ-ċirkolazzjoni portali) u disponibbiltà bijoloġika (jiġifieri preżenza f'demm sistemiku u f'tessuti) minn degradazzjoni kimika minħabba metaboliżmu fil-ħajt tal-musrana jew trasport ta' effluss lura għal-lumen intestinali jew metaboliżmu presistemiku fil-fwied, fost fatturi oħra (10). Disponibbiltà bijoloġika tal-komponent tossiku (kompost prinċipali jew metabolite) hija parametru kritiku fil-valutazzjoni tar-rikju għall-bniedem (estrapolazzjoni ta' doża minn għoli għal baxx, estrapolazzjoni minn rotta għal rotta) għal derivazzjoni ta' valur intern minn NOAEL jew BDM esterni (doża applikata). Għal effetti tal-fwied fuq amministrazzjoni orali, huwa l-assorbiment orali li jkun biżżejjed. Iżda għal kull effett minbarra fil-portal ta' dħul, hija d-disponibbiltà bijoloġika li b'mod ġenerali tkun parametru aktar affidabbli għal użu ulterjuri fil-valutazzjoni tar-riskju, mhux l-assorbiment.

▼M4

Bijopersistenza: Ara “Persistenza”.

Bijotrasformazzjoni: Konverżjoni kimika (Normalment enżematika) ta’ kimika għall-ittestjar ta’ interess f’kimika differenti fil-ġisem. Sinonima ma’ “metaboliżmu”.

C_{max}: Konċentrazzjoni massima (quċċata) ta’ demm (plażma/serum) wara l-amminsitrazzjoni jew eskreta massima (quċċata) (f’urina jew rawt) wara l-amministrazzjoni.

Rata ta’ kklirjar: Miżura kwantitattiva tar-rata li fiha kimika għall-ittestjar titneħħa mid-demm, plażma jew ċerta tessut f’kull unità ta’ ħin.

Kompartament: Parti strutturali jew bijokemikali (jew unità) ta’ ġisem, tessut jew ċellola, li hija separata mill-bqija.

Mogħdiji ta’ dissotifikazzjoni: Serje ta’ passi li jwasslu għall-eliminazzjoni ta’ kimiċi tossiċi mill-ġisem, permezz ta’ bidla metabolika jew eskrezzjoni.

Distribuzzjoni: Tixrid ta’ kimika għall-ittestjar u d-derivattivi tagħha fl-organiżmu kollu.

Enzimi/Isożimi: Proteini li jikkatalizzaw ir-reazzjonijiet kimiċi. Isożimi huma enzimi li jikkatalizzaw reazzjonijiet kimiċi simili iżda huma differenti fis-sekwenza tal-aċidi amino tagħhom.

Parametri enzimatiċi: K_m: Kostant ta’ Michaelis u V_{max}: veloċità massima.

Eskrezzjoni: Proċess(i) li permezz tagħhom titneħħa kimika għall-ittestjar jew il-metaboliti tagħha mill-ġisem.

B’mod esoġenu: Introdotti minn jew prodotti barra mill-organiżmu jew mis-sistema.

Estrapolazzjoni: Inferenza ta’ valur wieħed jew iktar mhux magħrufin abbażi ta’ dak li huwa magħruf jew ġie osservat.

Nofs ħajja ($t_{1/2}$): Il-ħin neċessarju għall-konċentrazzjoni ta’ kimika għall-ittestjar biex tonqos bin-nofs f’kompartament. Din tipikament tirreferi għall-konċentrazzjoni tal-plażma jew l-ammont ta’ kimika għall-ittestjar fil-ġisem kollu.

Induzzjoni/Induzzjoni ta’ enzimi: Sinteżi tal-enzimi bħala rispons għal stimulu ambjentali jew molekula li tinduċi.

Linearità/kinetiċi lineari: Proċess huwa lineari fit-termini tal-kinetiċi meta r-rati kollha ta’ trasferiment bejn il-kompartamenti huma proporzjonati għall-ammonti jew il-konċentrazzjonijiet preżenti, jiġifieri l-ewwel ordni. Konsekwentement, il-volumi tal-ikklirjar u d-distribuzzjoni huma kostanti, kif ukoll in-nofs ħajjiet. Il-konċentrazzjonijiet miksuba huma proporzjonati għar-rata ta’ dożaġġ (espożizzjoni), u l-akkumulazzjoni hija titbassar iżjed faċilment. Il-linearità/non linearità tista’ tiġi vvalutata billi jiġu mqabbla l-paramteri rilevanti, eż. AUC, wara dozi differenti jew wara espożizzjoni unika u ripetuta. Nuqqas ta’ dipendenza fuq id-doża jista’ jkun indikattiv ta’ saturazzjoni tal-enzimi involuti fil-metaboliżmu tal-kompost, żieda fl-AUC wara espożizzjoni ripetuta meta mqabbla ma ’ espożizzjoni unika tista’ tkun indikattiva għall-inibizzjoni tal-metaboliżmu u nuqqas fl-AUC jista’ jkun indikattiv li qed jinduċi l-metaboliżmu [ara wkoll (11)].

▼M4

Bilanċ tal-massa: Kontabbiltà tal-kimika għall-ittestjar li tkun dieħla u ħierġa mis-sistema.

Bilanċ tal-materjal: Ara "bilanċ tal-massa".

Mekkaniżmu (Mod) ta' tossiċità/Mekkaniżmu (Mod) ta' azzjoni: Mekkaniżmu ta' azzjoni jirreferi għal interazzjonijiet bijokimiċi speċifiċi li fihom kimika għall-ittestjar tipproduċi l-effetti tagħha. Mod ta' azzjoni jirreferi għal mogħdiji iktar ġenerali li jwasslu għat-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar.

Metaboliżmu: Sinonima ma' "bijotrasformazzjoni".

Metaboliti: Prodotti ta' metaboliżmu jew proċessi metaboliċi.

Assorbiment Orali: Il-perċentwal tad-doża tal-kimika għall-ittestjar assorbita mis-sit tal-amminsitrazzjoni (jiġifieri sistema tal-GI). Dan il-paramteru kritiku jista' jintuża biex wieħed jifhem il-frazzjoni tal-kimika għall-ittestjar amministrata li tasal sal-vina portali, u sussegwentament il-fwied.

Koeffiċjent tal-parti: Magħruf ukoll bħala l-koeffiċjent tad-distribuzzjoni, huwa kejl tas-solubilità differenzjali ta' kimika f'żewġ solventi.

Livelli tal-quċċata tad-demm (plażma/serum): Konċentrazzjoni massima (quċċata) tad-demm (plażma/serum)wara l-amminstrazzjoni (ara wkoll "C_{max}").

Persistenza (persistenza bijoloġika): Preżenza fit-tul ta' kimika (f'sistema bijoloġika) minħabba reżistenza għal degradazzjoni/eliminazzjoni.

Aqra min-naħa għall-oħra: L-informazzjoni dwar il-punt tat-tmiem għal kimika waħda jew aktar tintuża biex isir tbassir tal-punt tat-tmiem għall-kimika mmirata.

Awtoradjografija Mikroskopika tar-Riċevitur (jew Mikroawtoradjografija tar-Riċevitur): Din it-teknika tista' tintuża biex tiskopri l-interazzjoni żenobijotika ma' siti tat-tessut speċifiċi jew popolazzjonijiet ta' ċelloli bħal pereżempju fl-irbit tar-riċevituri jew mod speċifiku ta' studji ta' azzjoni li jistgħu jirrikjedu riżoluzzjoni għolja u sensittività għolja li tista' ma tkunx fattibbli ma' tekniki oħra bħall-awtoradjografija tal-ġisem kollu.

Rotta ta' amministrazzjoni (orali, IV, dermali, inalazzjoni, eċċ.): Tirreferi għall-mezzi li bihom kimiċi jkunu amministrati lill-ġisem (eż. mill-ħalq b'gavage, mill-ħalq b'dieta, mill-ġilda, man-nifs 'il ġewwa, mill-vina, eċċ).

Saturazzjoni: Stat li bih wieħed jew aktar mill-proċessi kinetiċi (eż. assorbiment, metaboliżmu jew ikklirjar) ikunu f'massimu (jiġifieri "saturati").

Sensittività: Kapaċità ta' metodu jew ta' strument li jiddistingwi bejn risponsi ta' kejl li jirrappreżentaw livelli differenti ta' interess varjabbli.

Livelli ta' stat stabbli tad-demm (plażma): L-istat mhux ekwilibrat ta' sistema miftuħa li fiha l-forzi kollha li jaġixxu fuq is-sistema huma eżattament kontrobilanċjati minn forzi ta' oppożizzjoni, f'tali manjiera li l-komponenti kollha tagħha huma stazzjonarji fil-konċentrazzjoni għalkemm fis-sistema hemm fluss ta' materjal.

Mudellar ta' Sistemi (Tossikokinetiċi bbażati fuq il-Fiżjoloġija, ibbażati fuq il-Farmakokinetika, Farmakokinetiċi bbażati fuq il-Fiżjoloġija, ibbażati fuq il-Bijoloġija, eċċ.): Mudell astratt li juża lingwa matematika biex jiddeskrivi l-aġir tas-sistema.

Tessut immirat: Tessut li fih ikun jidher effett prinċipali avvers ta' sustanza tossika.

▼**M4**

Kimika għall-ittestjar: Kwalunkwe kimika jew taħlita ttestjati bl-użu ta' dan il-Metodu għall-Ittestjar.

Distribuzzjoni tat-Tessuti: Ċaqliq riversibbli ta' kimika għall-ittestajr minn post fil-ġisem għall-post ieħor. Id-distribuzzjoni tat-tessut tista' tiġi studjata mid-dissezzjoni ta' organu, l-omoġenizzazzjoni, il-kombustjoni u l-għadd ta' xintillazzjonijiet likwidi jew permezz ta' awtoradjografija kwalitattiva u/jew kwantitattiva tal-ġisem kollu. Tal-ewwel hija utli biex jinkisbu l-konċentrazzjoni u l-perċentwali ta' rkupru minn tessuti u mill-karakss li jifdal tal-istess annimali, iżda tista' ma jkolliex riżoluzzjoni għat-tessuti kollha u tista' jkollha rkupru kumplessiv li huwa inqas mill-ideal (< 90 %). Ara d-definizzjoni għal tal-aħħar hawn fuq.

$\mathbf{T_{max}}$: Ħin biex jintlaħaq C_{max}.

Tossikokinetiċi (Farmakokinetiċi): Studju tal-assorbiment, distribuzzjoni, metaboliżmu, eskrezzjoni ta' kimiċi tul iż-żmien.

Validazzjoni tal-mudelli: Proċess ta' valutazzjoni tal-adegwatezza ta' mudell biex jiddeskrivi b'mod konsistenti d-dejta disponibbli dwar it-tossikokinetika. Mudelli jistgħu jkunu vvalutati permezz ta' paragun ta' statistika u viżiv ta' tbasssir ta' mudelli b'valuri sperimentali ma' varjabbli komuni indipendenti (eż. ħin). Kemm tkun l-evalwazzjoni għandu jkun iġġustifikat b'rabta mal-użu maħsub tal-mudell.

▼B

B.37. **ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIĊITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* WARA L-ESPOŻIZZJONI AKUTA**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni ta' l-effetti tossiċi tas-sustanzi, huwa importanti li jiġi ikkonsidrat il-potenzjal ta' ċerti klassijiet ta' sustanzi biex jikkawża tipi speċifiċi ta' newrotossiċità li jistgħu ma jidrux fi studji tossiċi oħra. Ċerti sustanzi *organophosphorus* jidru li jikkawżaw dewmien tan-newrotossiċità u għandhom jitqisu kandidati għall-evalwazzjoni.

Testijiet ta' *screening in vitro* jistgħu jitħaddmu biex jiddentifikaw dawk is-sustanzi, jistgħu jikkawżaw dewmien fil-*polyneuropathy*; madankollu, sejbiet negattivi fl-istudji *in vitro* ma jipprovdux evidenza li s-sustanza tat-test mhiex *newrotossikant.*

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sustanzi *organophosphorus* jinkludu l- *organophosphorus esters, it-thioesters uncharged* jew *l-anhydrides* ta' l-aċdi *organophosphoric, organophosphonic* jew *organophosphoramidic* jew ta' l-aċdi *phosphorothioic, phosphonothioic* jew *phosphorothioamidic relatati*, jew sustanzi oħra li jistgħu jikkawżaw dewmien ta' newrotossiċità li xi drabi tidher f'din il-klassi ta' sustanzi.

Id-dewmien tan-newrotossiċità huwa sindromu assoċjat ma' *l-onset* tad-dewmien prolungat ta' l-*ataxia, id-distal axonopathies* fil-korda spinali u n-nerv periferali, u l-inibizzjoni u x-xjuħija tan-*neuropathy target esterase (NTE)* fit-tessut newrali.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanza ta' referenza tista' tiġi ttestjata bi grupp ta' kontroll pożittiv li juri li taħt il-kundizzjonijiet tat-test tal-laboratorju, ir-rispons ta' l-ispeċi ittestjati ma nbidilx b'mod sinifikanti.

Eżempju ta' newrotossikant użat f'irxa wisgħa huwa il-fosfat *tri–o–tolyl phosphate (Cas 78-30-8, Einecs 201-103-5, Cas* nomenkaltura: l-aċdu fosforiku, *tris(2–methylphenyl)ester),* magħruf ukoll bħala *tris–o–cresylphosphate.*

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test tiġi somministrata oralment lit-tiġieġ domestiku f'doża waħda. Meta huwa xieraq, it-tiġieġ huwa mħares mill-effetti *cholinergic* akuti. L-annimali jiġu osservati għal 21 jum għal imġieba anormali, *ataxia* u paraliżi.. Il-kejl bijokemikali, b'mod partikolari l-inibizzjoni tan-*neuropathy target esterase (NTE),* isir fuq it-tiġieġ li jingħażel bl-addoċċ minn kull grupp. Dan normalment isir 24 u 48 siegħa wara d-dożaġġ.Wieħed u għoxrin jum wara l-espożizzjoni l-bqija tat-tiġieġ jiġi maqtul u ssir l-eżaminazzjoni ħispatoloġika ta' tessuti newrali magħżula.

▼B

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.5.1. **Theġjija**

Tiġieġ b'saħħtu u adult żagħżugħ li huwa ħieles minn mard virali u l-medikazzjoni li jfixxklu u li m'għandux anormalitajiet fil-mixja għandu jingħażel bl-adoċċ u assenjati għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament.Għandu wkoll jadatta għall kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 jiem qabel il-bidu ta' l-istudju.

Gaġeġ jew spazji magħluqa li huma kbar biżżejjed biex jippermettu ċ-ċaqliq ħieles tat-tiġieġ, u għandu jkun faċli biex tiġi osservata l-mixja tiegħu.

Id-dożaġġ bis-sustanza tat-test għandha normalment tingħata oralment bl-għalf li jingħata bilfors, kapsuli tal-ġelatina, jew metodu li jitqabbel magħhom. Il-likwidi jistgħu jingħataw mhux imħallta bl-ilma jew maħlula f'mezz xieraq bħal ma huwa ż-żejt tal-qamħ; jekk hu possibbli s-solidi għandhom jinħallu la darba dożi kbar tas-solidi fil-kapsuli tal-ġelatina jistgħu ma jiġux assorbiti sew. Għall-mezzi li mhumiex akwei il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa, u jekk le għandhom jiġu determinati qabel it-test.

1.5.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.5.2.1. *Annimali għat test*

It-tiġieġ żagħżugħ adult domestiku u li jbid (*Gallus gallus domesticus*), li għandu minn 8 sa 12-il xahar huwa rakkomandat. Għandhom jintużaw daqsijiet u razez standard. Normalment it-tiġieġ għandu jitrabba f'kundizzjonijiet li jippermettu ċ-ċaqliq ħieles.

1.5.2.2. *In-numru u s-sess*

Barra l-grupp tat-trattament, għandhom jintużaw kemm il-grupp ta' mezz ta' control u kemm dak ta' kontroll pożittiv. Il-grupp tal-mezz ta' kontroll għandu jiġi trattat bl-istess mod tal-grupp għat-trattament, ħlief li s-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test titneħħa.

Għandu jintużaw numru biżżejjed ta' tiġieġ f'kull grupp ta' għasafar sabiex mill-inqas sitt għasafar jistgħu jinqatlu għad-determinazzjoni bijokemikali (tlieta f'kull żewġ punti) u sitta jistgħu jibqgħu jgħixu tul il-perjodu ta' osservazzjoni għall-patoloġija ta' 21 jum.

Il-grupp ta' kontroll pożittiv jista' jseħħ fl-istess ħin jew ikun grupp ta' kontroll riċenti storiku. Għandu mill-inqas ikollu sitt tiġiġiet, trattati b'newrotossikant b'dewmien magħruf, tliet tiġiġiet għall-bijokemistrija u tliet tiġiġiet għall-patoloġija. Huwa rakkomandat laġġornament perjodiku tad-data storika. Data ġdida ta' kontroll pożittiv għandha tiġi żviluppata meta xi element essenzjali (eż. ir-razza, l-għalf u l-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew) ta kif isir it-test jinbidel mil-laboratorju attiv.

▼B

1.5.2.3. *Il-livelli tad-doża*

Għandu jsir studju preliminary bl-użu ta' numru xieraq ta' tiġieġ u ta' gruppi ta' livelli tad-doża sabiex jiġi stabbilit il-livell li se jintuża fl-istudju prinċipali. Il-mewt hija tipikament meħtieġa f'dan l-istudju preliminari sabiex tiġi stabbilita doża adegwata ta' l-istudju prinċipali. Madankollu, sabiex tiġi evitata il-mewt minħabba l-effetti *cholinergic* akuti, jista' jintuża *l-atropine* jew aġent protettiv ieħor magħruf li ma jfixkilx ir-rispons tad-dewmien fin-newrotossiċità. Varjetà ta' metodi għat-test jistgħu jintużaw biex tiġi kkalkulata d-doża massima mhux letali tas-sustanzi għat-test (Ara l-metodu B.1bis). Id-data storika fit-tiġieġa jew informazzjoni tossikoloġika oħra tista' tkun ta' għajnuna fl-għażla tad-doża.

Il-livell tad-doża tas-sustanza għat-test fl-istudju prinċipali għandu jkun għoli kemm jista' jkun waqt li jitqiesu ir-riżultati ta' l-istudju preliminari għall-għażla tad-doża u l-limitu fuqani tad-doża tal-piż tal-ġisem ta' 2 000 mg/kg. F'21 jum, kwalunkwe mortalità li tista' sseħħ m'għandhiex tfixkel is-sopravivenza ta' biżżejjed annimali għall-bijokemistrija (sitta) u għall-istoloġija (sitta). L-*atropine* jew aġent protettiv ieħor, magħruf li ma jfixkilx ir-rispons tad-dewmien fin-newrotossiċità, għandu jintuża sabiex tiġi evitata l-mewt minħabba effetti *cholinergic* akuti.

1.5.2.4. *It-test tal-limitu*

Jekk test f'livell wieħed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 2 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/ġurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika ħlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-ħtieġa li jiġi użat livell ogħla ta' doża.

1.5.3. **Il-perjodu ta' l-Osservazzjoni**

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun ta' 21 jum.

1.5.4. **Il-proċedura**

Wara s-somministrazzjoni ta' aġent protettiv sabiex jevita l-mewt minħabba l-effett *cholinergic* akut, is-sustanza għat-test tiġi somministrata f'doża waħda.

Osservazzjoni ġenerali

L-Osservazzjonijiet għandhom jibdew mill-ewwel wara l-espożizzjoni. It-tiġieġ kollu għandu jiġi osservat bosta drabi waqt l-ewwel jumejn imbagħad mill-inqas darba kuljum għall-perjodu ta' 21 jum jew sal-qtil skedat. Għandhom jiġu rrekordjati s-sinjali kollha tat-tossiċità, inklużi l-ħin ta' l-*onset*, it-tip, il-qawwa u d-dewmien ta' l-anormalitajiet fl-imġiba. *L-ataxia* għandha titkejjel fuq skala ordinali ta' gradazzjoni li tikkonsisti f'erba' livelli u l-paraliżi għandha tiġi nnutata. Mill-inqas darbtejn fil-ġimgħa t-tiġieġ magħżul għall-patoloġija għandu jinħareġ mill-gaġeġ u jiġi suġett għal perjodu ta' attività *forced motor*, bħal ngħidu aħna t-tlugħ mas-sellun, sabiex tiġi faċilitata l-osservazzjoni ta' l-effetti tossiċi minimali. L-annimali li qed imutu u dawk fi tbattija jew uġigħ għandhom jitneħħew, jinqatlu b'mod uman u sottomessi għan-nekropsija.

▼B

Il-piż tal-ġisem

It-tiġieġ kollu għandu jintizen eżatt qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u mill-inqas darba fil-ġimgħa wara dan.

Bijokemistrija

Sitt tiġiġiet jingħażlu bl-adoċċ minn kull grupp tal-mezz ta' kontroll u ta' trattament, u tliet tiġiġiet mill-grupp ta' kontroll pożittiv (meta dan il-grupp iseħħ fl-istess żmien), għandhom jinqatlu fi żmien ftit jiem wara d-dożaġġ. Il-moħħ u l-korda spinali lumbar jiġu mħejjija u analizzati għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-neuropath target esterase. Barra minn hekk, ittħejjija u l-analiżi tat-tessut tan-nerv xjatiku jistgħu jkunu ta' għajnuna għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-neuropath target esterase. Normalment, tlett għasafar tal-grupp ta' kontroll u ta' kull trattament jinqatlu wara 24 siegħa u tlieta jinqatlu wara 48 siegħa. It-tlett tiġiġiet tal-kontrolli pożittivi għandhom jinqatlu f'24 siegħa. Jekk l-osservazzjoni ta' sinjali kliniċi ta' intossikazzjoni (dan jista' jiġi evalwat permezz ta' l-osservazzjoni tal-ħin ta' *l-onset* tas-sinjali *cholinergic)* juru li l-aġent tossiku jista' jitwarrab bil-mod allura huwa preferibbli li jittieħed kampjun tat-tessut għal darbtejn minn kull wieħed mit-tlett għasafar bejn 24 sa 72 siegħa wara d-dożaġġ.

L-analiżi ta' l-acetylcholinesterase (AChE) tista' ssir ukoll fuq dawn il-kampjuni jekk ikun xieraq. Madankollu, ir-reattivazzjoni spontanja ta' l- AChE tista' sseħħ *in vivo*, u b'hekk twassal għal nuqqas ta' valutazzjoni dwar l-effikaċja tas-sustanza bħala inibitur AChE.

Nekropsija Grossa

In-nekropsija grossa ta' l-annimali kollha (skedati li jinqatlu u jinqatlu meta jkunu moribondi) għandha tinkludi l-osservazzjoni tad-dehra tal-moħħ u tal-korda spinali.

L-eżaminazzjoni Ispatologika

It-tessut newrali mill-annimali li jibqgħu ħajjin fil-perjodu ta' l-osservazzjoni u li ma jintużawx għal studji bijokemikali għandhom ikunu suġġetti għall-eżaminazzjoni mikroskopika. It-tessuti għandhom jiġu ffissati *in situ,* bl-użu ta' tekniki ta' perfużjoni. Is-sezzjonijiet għandhom jinkludu ċ-ċerebellum (il-livell mid-lonġitudinali), il-*medulla oblongata*, il-korda spinali, u n-nervituri periferali. Is-sezzjonijiet tal-korda spinali għandhom jittieħdu mill-parti ċervikali ta' fuq, miż-żoni *mid-thoracic* u *lumbo-sacral*. Għandhom jittieħdu sezzjonijiet miż-żona *distal* tan-nerv tibjali u l-friegħi tiegħu sal-muskolu *gastrocnemial* u tan-nerv xjatiku. Is-sezzjonijiet għandhom jittebbgħu bi tbajja speċifiċi xierqa ta' *myelin u ta' l-axon.*

2. **DATA**

Normalment ir-riżultati negattivi fuq l-*endpoints* magħżula f'dan il-metodu (l-osservazzjoni tal-bijokemistrija, ta' l-ispatoloġija u ta' l-imġiba) ma jitolbux iktar ittestjar għad-dewmien tan-newrotossiċità. Riżultati żbaljati jew inkonklussivi għal dawn *l-endpoints* jistgħu jitolbu evalwazzjoni addizjonali.

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun imqassra f'għamla tabulari, li turi n-numru ta' l-annimali għal kull grupp tat-test fil-bidu tiegħu, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, l-effetti ta' l-imġiba jew dawk bijokemikali, it-tip u l-gravità ta' dawn il-feriti jew effetti, u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip u gravità tal-feriti jew ta' l-effett.

▼B

Is-sejbiet ta' dan l-istudju għandhom jiġu elvawati f'termini ta' l-inċidenza, tal-gravità, u tal-korrelazzjoni tal-effetti ta' l-imġiba, ta' dawk bijokemikali u dawk ispatoloġiċi u kwalunkwe effetti oħra osservati fil-gruppi ta' kontroll u dawk trattati.

Ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati permezz ta' metodi ta' statistika xierqa u ġeneralment aċċettabbli. Il-metodi ta' statistika użati għandhom jiġu magħżula waqt id-disinn ta' l-istudju.

3. **RAPPORTAĠĠ**

IR-RAPPORTTAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk inhu possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

3.1. Annimali għat-test

— l-ispeċi użati;

— in-numru u l-età ta' l-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, eċċ,;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— id-dettalji tat-tħejjija tas-sustanza għat-test, l-istabilità u l-omoġeneità fejn hu xieraq;

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;

— id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma;

— Ir-rationale għall-għażla tad-doża;

— L-ispeċifikazzjoni tad-doži somministrati, inklużi d-dettalji tal-mezz, tal-volum u tal-forma fiżika tal-materjal somministrat;

— L-identità u d-dettalji tas-somministrazzjoni ta' kwalunkwe aġent protettiv.

Riżultati:

— id-data tal-piż tal-ġisem;

— id-data tar-rispons tossiku fi grupp, inkluża l-mortalità;

— in-natura, l-gravità u d-dewmien taż-żmien ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (kemm jekk huma riversibbli jew le);

— deskrizzjoni dettaljata tal-metodi u s-sejbiet bijokemikali;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha ispatoloġiċi;

— fejn hu xieraq, it-trattament statistiku tar-riżultati.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

Dan il-metodu huwa analogu għal OECD TG 418.

▼B

B.38. **ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIĊITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* STUDJU TA' DOŻA RIPETUTTA GĦAL 28 ĠURNATA**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni ta' l-effetti tossiċi tas-sustanzi, huwa importanti li jiġi ikkonsidrat il-potenzjal ta' ċerti klassijiet ta' sustanzi biex jikkawża tipi speċifiċi ta' newrotossiċità li jistgħu ma jidrux fi studji tossiċi oħra. Ċerti sustanzi organophosphorus jidru li jikkawżaw dewmien tan-newrotossiċità u għandhom jitqisu kandidati għall-evalwazzjoni.

Testijiet ta' *screening in vitro* jistgħu jitħaddmu biex jiddentifikaw dawk is-sustanzi jistgħu jikkawżaw dewmien fil-*polyneuropathy*; madankollu, sejbiet negattivi fl-istudji *in vitro* ma jipprovdux evidenza li s-sustanza tat-test mhiex newrotossikant.

Dan it-test ta' 28 jum tad-dewmien tan-newrotossiċità jipprovdi l-informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibli li jista' jkun hemm minħabba espożizzjonijiet repetuti f'perjodu limitat ta' żmien. Jipprovdi informazzjoni fuq ir-rispons tad-doża u jista' jipprovdi kalkolu ta' *no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati), li jista' jkun utli sabiex jiġu stabbiliti l-kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sustanzi *organophosphorus* jinkludu *l- organophosphorus esters, it-thioesters uncharged* jew *l-anhydrides* ta' l-aċdi *organophosphoric, organophosphonic* jew *organophosphoramidic* jew ta' l-aċdi *phosphorothioic, phosphonothioic* jew *phosphorothioamidic* relatati, jew sustanzi oħra li jistgħu jikkawżaw dewmien ta' newrotossiċità li xi drabi tidher f'din il-klassi ta' sustanzi.

Id-dewmien tan-newrotossiċità huwa sindromu assoċjat ma' l-onset tad-dewmien prolungat ta' l-ataxia, id-distal axonopathies fil-korda spinali u n-nerv periferali, u l-inibizzjoni u x-xjuħija tan-*neuropathy target esterase (NTE*) fit-tessut newrali.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Id-doži ta' kuljum tas-sustanza għat-test huma somministrati oralment lit-tiġieġ domestiku għal 28 jum. L-annimali jiġu osservati għallinqas kuljum għal anormalitajiet fl-imġiba, għall-*ataxia* u għall-paraliżi sa 14-il jum wara l-aħħar doża. Il-kejl bijokemikali, b'mod partikolari l-inibizzjoni *tan-neuropathy target esterase (NTE),* isir fuq it-tiġieġ li jingħażel bl-addoċċ minn kull grupp. Dan normalment isir 24 u 48 siegħa wara d-dożaġġ. Ħmistax wara l-aħħar doża il-bqija tat-tiġieġ jiġi maqtul u ssir eżaminazzjoni ispatoloġika tat-tessuti newrali magħżula.

▼B

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

Tiġieġ b'saħħtu u adult żagħżugħ li huwa ħieles minn mard virali u l-medikazzjoni li jfixxklu u li m'għandux anormalitajiet fil-mixja għandu jingħażel bl-adoċċ u assenjati għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament.Għandu wkoll jadatta għall kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 jiem qabel il-bidu ta' l-istudju.

Gaġeġ jew spazji magħluqa li huma kbar biżżejjed biex jippermettu ċ-ċaqliq ħieles tat-tiġieġ, u għandu jkun faċli biex tiġi osservata l-mixja tiegħu.

Id-dożaġġ orali kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, għandu jitwettaq preferibbilment permezz ta' l-għalf mogħti bil-fors jew bis-sommistrazzjoni tal-kapsuli tal-ġelatina. Il-likwidi jistgħu jingħataw mhux imħallta bl-ilma jew maħlula f'mezz xieraq bħal ma huwa ż-żejt tal-qamħ; jekk hu possibbli s-solidi għandhom jinħallu la darba dożi kbar tas-solidi fil-kapsuli tal-ġelatina jistgħu ma jiġux assorbiti sew. Għall-mezzi li mhumiex akwei il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa, u jekk le għandhom jiġu determinati qabel it-test.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

Annimali għat-test

It-tiġieġ żagħżugħ adult domestiku u li jbid (Gallus gallus domesticus), li għandu minn 8 sa 12-il xahar huwa rakkomandat. Għandhom jintużaw daqsijiet u razez standard. Normalment it-tiġieġ għandu jitrabba f'kundizzjonijiet li jippermettu ċ-ċaqliq ħieles.

In-numru u s-sess

Ġeneralment għandhom jintużaw mill-inqas tlett gruppi ta' trattament u grupp ta' kontroll tal-mezz. Il-grupp ta' kontroll tal-mezz għandu jiġi trattat bl-istess mod bħal dak ta' trattament ħlief li s-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test hija mneħħija.

Għandu jintużaw numru biżżejjed ta' tiġieġ f'kull grupp ta' għasafar sabiex mill-inqas sitt għasafar jistgħu jinqatlu għad-determinazzjoni bijokemikali (tlieta f'kull żewġ punti) u sitt għasafar jistgħu jgħixu waqt l-14-il jum tal-perjodu ta' osservazzjoni wara t-trattament għall-patoloġija.

Livelli tad-doża

Il-livelli tad-doża għandhom jingħażlu waqt li jitqiesu r-riżultati tat-test akut fuq id-dewmien tan-newrotossiċità u kwalunkwe tossiċità oħra li teżisti jew id-data kinetika disponibbli għall-*compound* tat-test. L-ogħla livell tad-doża għandu jingħażel bl-għan li jkun hemm żieda ta' effetti tossiċi, preferibbilment tan-newrotossiċità b'dewmien, iżda mhux ta' mewt jew tbatija ovvja. Wara, sekwenza nieżla tal-livelli tad-doża għandha tingħażel bl-għan li jidher kwalunkwe rispons relatat mad-doża u *no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati), fl-iktar livell ta' doża baxx.

▼B

Test ta' limitazzjoni

Jekk test f'livell wieħed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/ġurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika ħlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-ħtieġa li jiġi użat livell ogħla ta' doża.

Perjodu ta' l-Osservazzjoni

L-annimali kollha għandhom jiġu osservati mill-inqas kuljum waqt il-perjodu ta' l-espożizzjoni u 14-il jum wara, sakemm ma jkunx hemm nekropsija skedata.

1.4.3. **Proċedura**

Animals are dosed with the test substance on seven days per week for a period of 28 days.

Osservazzjoni ġenerali

L-osservazzjonijiet għandhom jibdew mill-ewwel wara li jibda t-trattament. It-tiġieġ kollu għandu jiġi osservat mill-inqas darba kuljum f'kull wieħed mit-28 jum ta' trattament, u għal 14-il jum wara d-dożaġġ jew sal-qtil skedat. Għandhom jiġu rrekordjati is-sinjali kollha ta' tossiċità inklużi il-ħin ta' l-*onset* tagħhom, it-tip, il-gravità u d-dewmien ta' żmien. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu, iżda mhux limitati għal, l-anormalitajiet ta' fl-imġiba. L-*ataxia* għandha titkejjel fuq skala ordinali ta' gradazzjoni li tikkonsisti f'erba' livelli, u għandha tiġi nnutata l-paraliżi. Mill-inqas darbtejn fil-ġimgħa it-tiġieġ għandu jittieħed barra l-gaġeġ u suġġett għal perjodu ta' attività *forced motor*, bħal ngħidu aħna t-tlugħ mas-sellum, sabiex tiġi faċilitata l-osservazzjoni ta' l-effetti tossiċi minimali. L-annimali moribondi li qed ibatu ħafna jew li huma muġugħa għandhom jitneħħew, jinqatlu b'mod uman u sottoposti għan-nekropsija.

Il-piż tal-ġisem

It-tiġieġ kollu għandu jintizen eżatt qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u mill-inqas darba fil-ġimgħa wara dan.

Bijokemistrija

Sitt tiġiġiet magħżula bl-addoċċ minn kull grupp ta' trattament u ta' kontroll tal-mezz, għandhom jinqatlu fi ftit jiem wara l-aħħar doża. Il-moħħ u l-korda spinali *lumbar* jiġu mħejjija u analizzati għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-*neuropath target esterase (NTE). B*arra minn hekk, it-tħejjija u l-analiżi tat-tessut tan-nerv xjatiku jistgħu jkunu ta' għajnuna għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-*neuropath target esterase (NTE)*. Normalment, tlett għasafar tal-grupp ta' kontroll u ta' kull trattament jinqatlu wara 24 siegħa u tlieta jinqatlu wara 48 siegħa wara l-aħħar doża. Jekk id-data mill-istudju akut jew studju ieħor (eż. it-tossikokinetiċi) turi li ħinijiet oħra tal-qtil wara d-dożaġġ finali huma preferibbli, mela għandhom jintużaw dawn il-ħinijiet u r-*rationale* tiġi dokumentata.

L-analiżi ta' l-acetylcholinesterase (AChE) tista' ssir ukoll fuq dawn il-kampjuni jekk ikun xieraq. Madankollu, ir-reattivazzjoni spontanja ta' l- AChE tista' sseħħ *in vivo*, u b'hekk twassal għal nuqqas ta' valutazzjoni dwar l-effikaċja tas-sustanza bħala inibitur AChE.

▼B

Nekropsija Grossa

In-nekropsija grossa ta' l-annimali kollha (skedati li jinqatlu u jinqatlu meta jkunu moribondi) għandha tinkludi l-osservazzjoni tad-dehra tal-moħħ u tal-korda spinali.

L-eżaminazzjoni Ispatologika

It-tessut newrali mill-annimali li jibqgħu ħajjin fil-perjodu ta' l-osservazzjoni u li ma jintużawx għal studji bijokemikali għandhom ikunu suġġetti għall-eżaminazzjoni mikroskopika. It-tessuti għandhom jiġu ffissati *in situ,* bl-użu ta' tekniki ta' perfużjoni. Is-sezzjonijiet għandhom jinkludu ċ-ċerebellum (il-livell mid-lonġitudinali), il-*medulla oblongata*, il-korda spinali, u n-nervituri periferali. Is-sezzjonijiet tal-korda spinali għandhom jittieħdu mill-parti ċervikali ta' fuq, miż-żoni *mid-thoracic* u *lumbo-sacral*. Għandhom jittieħdu sezzjonijiet miż-żona *distal* tan-nerv tibjali u l-friegħi tiegħu sal-muskolu *gastrocnemial* u tan-nerv xjatiku. Is-sezzjonijiet għandhom jittebbgħu bi tbajja speċifiċi xierqa ta' *myelin u ta ' l-axon.* Fil-bidu l-eżaminazzjoni mikroskopika għandha titwettaq fuq it-tessuti priservati tal-annimali kollha fil grupp ta' kontroll u f'dak ta' doża għolja. Fejn hemm evidenza ta' l-effetti fil-grupp ta' doża għolja, l-eżaminazzjoni mikroskopika għandha titwettaq ukoll fuq it-tiġieġ li qedgħin fil-gruppi ta' doża intermedjarja u baxxa.

2. **DATA**

Normalment ir-riżultati negattivi fuq l-*endpoints* magħżula f'dan il-metodu (l-osservazzjoni tal-bijokemistrija, ta' l-ispatoloġija u ta' l-imġiba) ma jitolbux iktar ittestjar għad-dewmien tan-newrotossiċità. Riżultati żbaljati jew inkonklussivi għal dawn *l-endpoints* jistgħu jitolbu evalwazzjoni addizjonali.

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun imqassra f'għamla tabulari, li turi n-numru ta' l-annimali għal kull grupp tat-test fil-bidu tiegħu, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, l-effetti ta' l-imġiba jew dawk bijokemikali, it-tip u l-gravità ta' dawn il-feriti jew effetti, u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip u gravità tal-feriti jew ta' l-effett.

Is-sejbiet ta' dan l-istudju għandhom jiġu elvawati f'termini ta' l-inċidenza, tal-gravità, u tal-korrelazzjoni tal-effetti ta' l-imġiba, ta' dawk bijokemikali u dawk ispatoloġiċi u kwalunkwe effetti oħra osservati fil-gruppi ta' kontroll u dawk trattati.

Ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati permezz ta' metodi ta' statistika xierqa u ġeneralment aċċettabbli. Il-metodi ta' statistika użati għandhom jiġu magħżula waqt id-disinn ta' l-istudju.

3. **RAPPORTAĠĠ**

IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk inhu possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

3.1. Annimali għat-test

— l-ispeċi użati;

— in-numru u l-età ta' l-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, eċċ,;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

▼B

3.2. Kundizzjonijiet tat-test:

— id-dettalji tat-tħejjija tas-sustanza għat-test, l-istabilità u l-omoġeneità fejn hu xieraq;

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;

— id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma;

— *Ir-rationale* għall-għażla tad-doża;

— L-ispeċifikazzjoni tad-doži somministrati, inklużi d-dettalji tal-mezz, tal-volum u tal-forma fiżika tal-materjal somministrat;

— *Ir-rationale* għall-għażla ta' ħinijiet oħra għad-determinazzjoni bijokemikali jekk mhux 24 u 48 siegħa.

3.3. Riżultati:

— id-data tal-piż tal-ġisem;

— id-data ta r-rispons tossiku permezz tal-livell tad-doża, inkluża l-mortalità;

— l-ebda livell ta' effett avvers osservat;

— in-natura, l-gravità u d-dewmien taż-żmien ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (kemm jekk huma riversibbli jew le);

— deskrizzjoni dettaljata tal-metodi u s-sejbiet bijokemikali;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha ispatoloġiċi;

— fejn hu xieraq, it-trattament statistiku tar-riżultati.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

Dan il-metodu huwa analogu għal OECD TG 419.

▼B

B.39. **TEST *IN VIVO* TA' SINTESI MHUX PROGRAMMATA TA' DNA (UDS) FUQ ĊELLULI TAL-FWIED TAL-MAMMIFERI**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 486 *In vivo* ta' Sintesi Mhux Programmata ta' DNA (UDS) fuq Ċelloli tal-Fwied tal-Mammiferi (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

L-għan tat-test *in vivo* ta' sintesi mhux programmata ta' DNA (UDS) fuq Ċelloli tal-fwied tal-mammiferi huwa biex jiġu identifikati sustanzi tat-test li joħolqu t-tiswija tad-DNA f'Ċelloli tal-fwied ta' annimali ttrattati (1), (2), (3), (4).

Dan it-testr *in vivo* jipprovdi metodu għall-investigazzjoni ta' l-effetti ġenotossiċi ta' kimiċi fil-fwied. Il-punt ta' l-aħħar imkejjel jagħti indikazzjoni tal-ħsara fid-DNA u t-tiswija sussegwenti fiċ-Ċelloli tal-fwied. Il-fwied ġeneralment huwa l-lok maġġuri tal-metabolismu ta' komposti assorbiti. Għalhekk huwa l-lok xieraq biex titkejjel il-ħsara fid-DNA *in vivo*.

Jekk ikun hemm prova li s-sustanza tat-test mhix ser tilħaq it-tessut immirat, mhuwiex xieraq li jintuża dan it-test.

L-aħħar punt ta' sintesi DNA (UDS) mhux programmata jitkejjel billi jiġi stabbilit l-assorbiment ta' nukleosidi mmarkati f'Ċelloli li ma jkunux għaddejin minn sintesi tad-DNA programmata (fasi S). Il-metodu ta' teknika l-aktar użat huwa d-determinazzjoni ta' l-assorbiment ta' tritium thymidine immarkat (3H-TdR) bl-awtoradjografija. Preferibbilment jintużaw il-fwied tal-far għat-testijiet *in vivo*. Jistgħu jintużaw tessuti oħra minklok il-fwied, iżda mhumiex is-suġġett ta' dan il-metodu.

L-iżvelar ta' rispons UDS jiddependi fuq in-numru ta' bażi DNA exxissi u mibdula fuq il-lok tal-ħsara. Għalhell, it-test UDS huwa partikolarment ta' valur biex tiġi żvelata r-riparazzjoni ta' segwenzi twal li jiġu mis-sustanza (20 sa 30 bażijiet). Bħala kuntrast, ir-riparazzjoni ta' segwenzi qosra (minn bażi waħda sa tlieta) tiġi żvelata b'sensitività anqas qawwija. Barra minn dan, jistgħu jirriżultaw ġrajjiet mutaġeniċi minħabba fin-nuqqas ta' riparazzjoni, riparazzjoni ħażina jew replikazzjoni ħażina tal-leżjonijiet fid-DNA. L-estensjoni tar-rispons tal-UDS ma tagħtix indikazzjoni dwar il-fedeltà tal-proċess ta' riparazzjoni. B'żieda ma' dan, huwa possibbli li li mutaġen jirreaġixxi mad-DNA iżda l-ħsara fid-DNA ma tissewwix permezz ta' proċess ta' riparazzjoni exissa. In-nuqqas ta' informazzjoni speċifika dwar l-attività mutaġenika mogħtija mit-test tal-UDS huwa kompensat bis-sensitività potenzali ta' dan il-punt aħħari għax jiġi mkejjel fil-ġenomu sħiħ.

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali Taqsima B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ċelloli li qed jissewwew: Ċelloli li l-numru ta' grani nukleari netti tagħhom (NNG) huwa ogħla minn valur determinat minn qabel, li għandu jiġi ġustifikat fil-laboratorju li fih jitwettaq it-test.

Grani nukleari netti (NNG): miżura kwantitattiva għall-attività UDS taċ-Ċelloli f'testijiet UDS awtoradjografiċi, kalkolati billi jitnaqqas in-numru medju ta' grani ċitoplasmiċi f'arei ċitoplasmiċi nukei ekwivalenti (CG) min-numru ta' grani nukleari (NG): NNG = NG - CG. L-għadd ta' NNG huma kalkolati għal Ċelloli individwali u imbagħad addizzjonati ma' Ċelloli f'kultura, f'kulturi paralleli, eċċ.

▼B

Sintesi DNA mhux skedata (UDS): sintesi ta' riparazzjoni DNA wara l-exissjoni u t-tneħħija ta' biċċa mid-DNA li jkun fiha reġjun ta' ħsara miġjuba minn sustanzi kimiċi jew aġenti fiżiċi.

1.3. PRINĊIPJI TA' DAN IL-METODU TA' TEST

It-test tal-UDS b'Ċelloli tal-fwied ta' mammiferi *in vivo* jindika sintesi ta' riparazzjoni DNA wara l-exissjoni u t-tneħħija ta' biċċa mid-DNA li jkun fiha reġjun ta' ħsara miġjuba minn sustanzi kimiċi njew aġenti fiżiċi. It-test hu normalment msejjes fuq l-inkorporazzjoni ta' 3H-TdR fiċ-ċelluli DNA tal-fwied li għandhom frekwenza baxxa ta' Ċelloli fil-fasi S taċ-ċiklu taċ-Ċelloli. It-teħid ta' 3H-TdR jiġi normalment stabbilit bl-awdjoradjografija, għax dan il-metodu ta' teknika mhuwiex suxxettibbli għal indħil minn Ċelloli fil-fasi S bħal, per eżempju, konteġġ ta' xintillazzjoni fil-fasi likwida.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Selezzjonijiet ta' l-ispeċi ta' annimali*

Normalment jintuża l-far, minkejja li tista' tintuża kull speċi xierqa ta' mammiferi. Għandhom jintużaw partijiet ġeneralment użati fil-laboratorju ta' annimali żgħar b'saħħithom adulti. Fil-bidu ta' l-istudju l-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali għandha tkun minima u ma tkunx iżjed minn ± 20 % tal-piż medju għal kull wieħed mis-sessi.

1.4.1.2. *Kondizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu*

Jiġu applikati l-kundizzjonijiet ġenerali msemmija fl-Introduzzjoni ġenerali għat-Taqsima B għalhemm il-mira għall-umdità għandha tkun ta' 50 sa 60 %.

1.4.1.3. *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Annimali b'saħħithom żgħar adulti jiġu assenjati mingħajr ordni għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'tali mod li jitnaqqsu l-effetti possibbli mil-fatt li jitqiegħdu f'gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati wieħed wieħed u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għallinqas għal ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

1.4.1.4. *Sustanza tat-test/preparazzjoni*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewwbin jew sospiżi f'solventi jew kontenituri xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament ta' l-annimali. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiġu ttrattati direttament jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda għas-sustanza tat-test kemm-il darba l-informazzjoni dwar l-istabbilità ma turix laċċettabbilità tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Is-solvent/mezz ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doża użata, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanza tat-test. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra minflok dawk l-aktar magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Hu rakkomandat li kemm jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolli*

Għandhom jiġu inklużi f'kull parti indipendenti ta' l-esperiment kontrolli pożittivi u negattivi fl-isterss ħin (solvent/mezz). Ħlief għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod bħall-annimali fil-grupp ta' trattament.

Il-kontrolli pożittivi għandhom ikunu sustanzi magħrufa li jipproduċu UDS meta somministrati f'livelli ta' espożizzjoni li huma meqjusa li jagħtu żieda li wieħed jista' jinnota fuq l-isfond. Kontrolli pożittivi li jeħtieġu attivazzjoni metabolika għandhom jintużaw f'dożi li joħolqu rispons moderat (4). Id-dożi jistgħu jingħażlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tad-dijapożitivi kodifikati lil min jaqrahom. Eżempji ta' sustanzi ta' kontroll pożittivi jinkludu:

Ħinijiet ta' teħid ta' kampjuni	Sustanza	Nru CAS	Nru EINECS
Teħid ta' kampjuni kmieni (2 sa 4 sigħat)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Teħid ta' kampjuni tard (12 sa 16-il siegħa)	N-2-fluworenilaċetamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi oħra xierqa. Huwa aċċettabbli li l-kontroll pożittiv għandu jiġi somministrat minn rotta differenti mis-sustanza tat-test.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Numru u sess ta' l-annimali**

Għandu jintuża numru adegwat ta' annimali biex titqies il-varjazzjoni bijoloġika naturali f'rispons ta' test. In-numru ta' annimali għandu jkun għall-inqas tliet annimali analizzabbli kull grupp. Fejn ikun ġie akkumulat database storiku sinjifikattiv, annimal wieħed jew tnejn biss jkunu meħtieġa għall-gruppi ta' kontroll pożittivi u negattivi fl-istess ħin.

Jekk fil-ħin li jsir l-istudju jkun hemm informazzjoni disponibbli minn studji fl-istess speċje u li jużaw l-istess rotta ta' espożizzjoni li juru li ma hemms differenzi sostanzjali fit-tossiċità bejn is-sessi, allura jkun biżżejjed li t-test isir fuq sess wieħed, preferibbilment dak maskil. Fejn l-espożizzjoni umana għall-kimiċi tista' tkun speċifika skond is-sess, bħal ma hu per eżempju għal ċerti aġenti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq.

1.5.2. **Skeda tat-trattament**

Is-sustanzi tat-test ġeneralment jiġu somministrati fi trattament singolu.

1.5.3. **Livelli tad-doża**

Normalment, jintużaw għall-inqas żewġ livelli ta' doża. L-ogħla doża hija mfissra bħala d-doża li tipproduċi sinjali ta' tossiċità hekk li livelli ogħla tad-doża, bbażati fuq l-istess reġim ta' dożaġġ, huma mistennija li jikkawżaw il-mewt. Ġeneralment, l-inqas doża għandha tkun minn 50 % sa 25 % ta' l-ogħla doża.

▼B

Is-sustanzi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi baxxi mhux tossiċi (bħal ma huma ormoni u nitroġeni) jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' l-issettjar tad-doża u għandhom jiġu valutati fuq bażi ta' każ b'każ. Jekk isir studju biex tinstab il-medda għax ma jkunx hemm disponibbli informazzjoni xierqa, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, billi jintużaw l-istess speċji, karatteristiċi, sess u dożaġġ ta' trattament li jintuża fl-istudju prinċipali.

L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fil-fwied (eż. nukleji piknotiċi).

1.5.4. **Test tal-limitu**

Jekk test ta' doża waħda ta' livell ta' għall-inqas 2 000 mg/kg piż tal-ġisem, meta jitwettaq trattament wieħed, jew bħala żewġ trattamenti fl-istess ġurnata, ma jipproduċix effetti tossiċi li wieħed jinduna bihom, u jekk ma tkunx mistennija l-ġenotossiċità fuq il-bażi ta' l-informazzjoni minn sustanzi strutturalment relatati, allura ma jitqiesx li jkun neċessarju li jsir studju komplet. L-espożizzjoni umana mistennija tista' tindika l-ħtieġa ta' livell ogħla ta' doża li għandu jintuża fit-test tal-limitu.

1.5.5. **Somministrazzjoni ta' doża**

Normalment is-sustanza tat-test tiġi somministrata b'gavage billi jintuża tubu għall-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni. Fejn ikunu ġustifikati, jistgħu jiġu aċċettati rotot oħra ta' espożizzjoni. Madankollu r-rotta intraperitonali mhix rakkomandata għax tista' tesponi l-fwied direttament għas-sustanza tat-test minflok permezz tas-sistema ċirkolatorja. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jiġi somministrat b'gavage jew b'injezzjoni f'ħin wieħed jiddependi fuq il-qies ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 2 ml/100g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ogħla minn dawn għandu jkun ġustifikat. Ħlief fil-każ ta' sustanzi li jirritaw jew korrożivi li normalment juru effetti aggravati b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbilità fil-volum tat-test għandha titnaqqas bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fuq il-livelli kollha tad-doża.

1.5.6. **Preparazzjoni taċ-Ċelloli tal-fwied**

Iċ-Ċelloli tal-fwied huma ppreparati minn annimali ttrattati normalment 12 sa 16-il siegħa wara t-teħid tad-doża. Ġeneralment ikun meħtieġ teħid ta' kampjuni ieħor addizzjonali u aktar kmieni (normalmeny sagħtejn sa erba' sigħat wara t-trattament) kemm-il darba ma jkunx hemm rispons pożittiv ċar fi 12 sa 16-il siegħa. Madankollu t-teħid ta' kampjuni jista' jsir f'ħinijiet oħra meta jkun ġustifikat fuq il-bażi ta' informazzjoni tossikokinetika.

Normalment il-kulturi ta' perjodu qasir ta' Ċelloli ta' manniferi jiġu stabbiliti billi l-fwied jitgħatta fil-post bil-kollaġenas u billi Ċelloli tal-fwied dissoċjati ġodda jitħallew jingħaqdu ma' superfiċji xierqa. Ċelloli tal-fwied minn annimali ta' kontroll negattiv għandu jkollhom vijabilità ta' għall-inqas 50 %.

1.5.7. **Determinazzjoni ta' UDS**

Iċ-Ċelloli tal-fwied iżolati ġodda tal-mammiferi huma inkubati normalment b'medjum li jkun fih 3H-TdR għal tul ta' żmien xieraq, eż. tliet sigħat sa tmienja. Fl-aħħar tal-perjodu ta' inkubazzjoni, il-medjum għandu jitneħħa miċ-Ċelloli, li imbagħad jistgħu jiġu inkubati b'medjum li jkun fih eċċess ta' timidina mhux ittikkettjata biex tnaqqas r-radjuattività mhux inkorporata ('cold chase'). Imbagħad iċ-Ċelloli jiġu mlaħalħa, ffissati u mnixxfin. Għal ħinijiet ta' inkubazzjoni itwal, il-cold chase jista' ma jkunx neċessarju. Id-dijapożittivi jixxarbu b'emulsjoni awtoradjografika, jiġu esposti fid-dlam (eż. imkessħin għal sebat ijiem sa erbatax-il ġurnata), żviluppati, mogħtika l-kulur, u jingħaddu il-grani tal-fidda esposti. Jiġu ppreparati żewġ jew tliet dijapożittivi minn kull annimal.

▼B

1.5.8. **Analiżi**

Il-preparazzjonijiet tad-dijapożittivi għandu jkollhom biżżejjed Ċelloli ta' morfoloġija normali li jippermettu valutazzjoni xierqa tal-UDS. Il-preparazzjonijiet jiġu eżaminati mikroskopikament għal sinjali ta' tossiċita qawwija (eż. piknoži, livelli ridotti ta' radjutik-kettjar).

Id-dijapożittivi għandhom jiġu kodifikati qabel ma jibda l-għadd tal-grani. Normalment jingħaddu 100 ċellula minn kull annimal minn għall-inqas żewġ dijapożittivi; l-għadd ta' inqas minn 100 ċellula/annimal għandu jkun ġustifikat. In-numru ta' grani ma jingħaddx għan-nuklei tal-fasi S, iżda tista' tiġi reġistrata l-proporzjon ta' Ċelloli tal-fasi S.

L-ammont ta' inkorporazzjoni ta' 3H-TdR fin-nuklei u ċ-ċitoplasma ta' Ċelloli morfoloġikament normali, kif ppruvat bid-deposizzjoni ta' grani tal-fidda, għandu jiġi stabbilit b'metodi xierqa.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Għandha tingħata informazzjoni individwali dwar dijapożittivi u annimali. Barra minn dan. L-informazzjoni kollha għandha titqassar f'forma ta' tabella. L-għadd ta' g rani nukleari netti (NNG) għandu jiġi kalkolat għal kull ċellula, għal kull annimal u għal kull doża u ħin billi jitnaqqsu l-għadd ta' CG mill-għadd ta' NG. Jekk jingħaddu "iċ-Ċelloli li qed jissewwew", il-kriterji għaċ-Ċelloli li qed jissewwew għandhom ikunu ġustifi-kati u msejsa fuq informazzjoni storika u ta' kontroll negattiv fl-istess ħin. Riżultati numeriċi jistgħu jiġu valutati b'metodi statis-tiċi. Jekk jintużaw, it-testijiet statistiċi għandhom jingħażlu u jkunu ġustifikati qabel ma jitwettaq l-istudju.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Eżempji ta' kriterji għal rispons pożittiv/negattiv jinkludu:

pożittiv (i) il-valuri NNG ogħla minn limitu determinat minn qabel li hu ġustifikat fuq il-bażi ta' informazzjoni storika tal-laboratorju; jew

(ii) il-valuri NNG sinjifikatament ogħla minn kontroll fl-istess ħin;

negattiv (i) il-valuri NNG fil-limitu/taħt il-limitu ta' kontroll storiku jew

(ii) il-valuri NNG mhux sinjifikatament ogħla minn kontroll fl-istess ħin

▼B

Għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika ta' l-informazzjoni: jiġifieri għandhom jitqiesu l-parametri bħal ma huma l-varjazzjoni bejn l-annimali, r-relazzjoni għar-rispons għad-doża u ċ-ċitossiċità. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet, jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. Madankollu, s-sinjifikanza statistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur għal rispons pożittiv.

Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività ta' sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ekwivoċi u inċerti irrispettivament min-numru ta' drabi li jirrepeti ruħu l-esperiment.

Riżultat pożittiv minn test UDS b'Ċelloli tal-fwied tal-mammiferi *in vivo* jindika li s-sustanza tat-test toħloq ħsara fid-DNA taċ-Ċelloli tal-fwied tal-mammiferi *in vivo* li tista' tissewwa b'sintesi tad-DNA mhux skedata *in vitro*. Riżultat negattiv jindika li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloqx ħsara fid-DNA li tiġi żvelata b'dan it-test.

Għandha tiġi diskussa l-probabilità li s-sustanza tat-test tilħaq iċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew speċifikatament it-tessut immirat (eż. tossiċità sistemika).

3. **RAPPORTAĠĠ**

RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz,

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Annimali ttestjati:

— speċi/razza użati;

— numru, età u sess ta' l-annimali;

— għejun, kundizzjonijiet dwar fejn jinżammu, dieta, eċċ.;

— piż individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test, inkluża l-medda ta' piż tal-ġisem, mezzi u devjazzjoni standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

— kontrolli pożittivi u negattivi (mezz/solvent);

— informazzjoni mill-istudju dwar il-medda, jekk ikun sar;

— raġuni prinċipali għall-għażla ta' livell tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test;

— dettalji dwar is-somministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— raġuni prinċipali dwar ir-rotta ta' somministrazzjoni;

— metodi biex jiġi verifikat li s-sustanza tat-test waslet għaċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew it-tessut immirat, jekk tkun applikabbli;

▼B

— konverżjoni mill-konċentrazzjoni (ppm) tas-sustanza tat-test dieta/ilma għax-xorb għad doża attwali (mg/kg piż tal-ġisem/jum) jekk tkun applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata dwar l-iskedi ta' trattament u teħid ta' kampjuni;

— metodi biex titqies it-tossiċità;

— metodu tal-preparazzjoni u kultura taċ-Ċelloli tal-fwied;

— teknika awtoradjografika użata;

— numru ta' dijapożitivi ppreparati u numru ta' Ċelloli li jingħaddu;

— kriterji ta' valutazzjoni;

— kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Riżultati:

— valuri medji individwali tad-dijapożittivi, ta' l-annimali u ta' gruppi għal grani nuklei, grani ċitoplasmiċi, u grani nukleari netti;

— relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, jekk tkun disponibbli;

— valutazzjoni statistika, jekk ikun hemm;

— sinjali ta' tossiċità;

— informazzjoni dwar kontroll pożittiv u negattiv (solvent/mezz) fl-istess ħin;

— informazzjoni dwar kontroll pożittiv u negattiv (solvent/mezz) storika bil-medda, mezzi u devjazzjonijiet standard;

— numru ta' Ċelloli li qed jissewwew, jekk magħruf;

— numru ta' Ċelloli tal-fasi S, jekk magħruf;

— vijabilità taċ-ċelluli.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In vivo* Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 123-133.

(3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), *In vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla. G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In vitro* and *In vivo*, Mutation Res., 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger--Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In vivo*/*In vitro* DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In vivo*/*In vitro* Hepalocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553-562.

▼M8

B.40. **KORRUŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IL-METODU TA' TTESTJAR TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANJA (TER))**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 430 tal-OECD (2015). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrożi viżibbli permezz tal-epidermis u fid-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1])]. Dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat B.40 jipprovdi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU (1) u s-CLP.

2. Il-valutazzjoni tal-korrużività tal-ġilda tipikament involviet l-użu ta' annimali tal-laboratorju (TM B.4, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD oriġinarjament adottata fl-1981, u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) (2). Minbarra t-TM B.40 preżenti, metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra għall-ittestjar tal-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi ġew validati u adottati bħala TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) (3) u TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) (4), li wkoll huma kapaċi jidentifikaw subkategoriji ta' sustanzi kimiċi korrużivi meta jkun hemm bżonn. Ġew adottati diversi metodi ta' ttestjar *in vitro* validati bħala TM B.46 (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD (5), biex jintużaw għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda. Dokument ta' gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom diversi sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (6).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmiem tas-saħħa umana. Hu bbażat fuq il-metodu ta' ttestjar tar-reżistenza elettrika transkutanja (TER) tal-ġilda tal-firien, li juża diski tal-ġilda biex jidentifika l-korrużivi mill-ħila tagħhom li jipproduċu telf ta' integrità ormali *stratum corneum* u funzjoni barriera. Il-linja gwida tat-test korrispondenti tal-OECD oriġinarjament ġiet adottata fl-2004 u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA.

4. Biex jiġi evalwat l-ittestjar tal-korrużjoni tal-ġilda *in vitro* għall-finijiet regolatorji, saru studji ta' qabel il-validazzjoni (7) segwiti minn studju tal-validazzjoni formali tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda (8) (9) (10) (11). L-eżitu ta' dawn

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

▼**M8**

l-istudji wassal għar-rakkomandazzjoni li l-metodu ta' ttestjar TER (imsejjaħ il-Metodu ta' Referenza Validat – VRM) jista' jintuża għall-finijiet regolatorji għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda *in vivo* (12) (13) (14).

5. Qabel ma metodu ta' ttestjar TER *in vitro* simili jew modifikat propost għall-korrużjoni tal-ġilda li mhuwiex il-VRM ikun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex tiġi żgurata s-similarità tiegħu għall-VRM, skont ir-rekwiżiti tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) (15). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu ta' ttestjar propost ġdid jew aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluż fil-linja gwida tat-test korrispondenti tal-OECD.

DEFINIZZJONIJIET

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

7. Studju tal-validazzjoni (10) u studji ppubblikati oħra (16) (17) irrapportaw li l-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien kapaċi jiddiskrimina bejn korrużivi tal-ġilda magħrufa u mhux korrużivi b'sensittività ġenerali ta' 94 % (51/54) u bi speċifiċità ta' 71 % (48/68) għal bażi ta' *data* ta' 122 sustanza.

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda *in vitro*. Jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP. Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar, kif murija mill-istudji ta' validazzjoni (8) (9) (10) (11), hi li dan ma jippermettix is-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi u ta' taħlitiet korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP. Il-qafas regolatorju applikabbli jiddetermina kif se jintuża dan il-metodu ta' ttestjar. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-saħħa (5). Għal evalwazzjoni sħiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermali wieħed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-IATA (6).

9. Firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw primarjament sustanzi ġiet ittestjata fil-validazzjoni li hi l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar u l-bażi ta' *data* empirika tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 60 sustanza kimika li tkopri firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi (8) (9). Fuq il-bażi tad-*data* ġenerali disponibbli, dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi u ta' stati fiżiċi li jinkludu likwidi, semisolidi, solidi u xama'. Madankollu, peress li għal ma hemmx disponibbli għalkollox oġġetti tat-test b'*data* ta' riferiment xierqa għal stati fiżiċi speċifiċi, ta' min jinnota li matul il-validazzjoni ġie vvalutat numru komparabbilment żgħir ta' xama' u ta' solidi korrużivi. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' sustanzi, il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' sustanzi. Barra minn hekk, dan il-metodu ta' ttestjar hu prežunt bħala applikabbli għal taħlitiet bħala estensjoni tal-applikabbiltà tiegħu għas-sustanzi. Madankollu, minħabba l-fatt li t-taħlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-taħlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' taħlitiet (*eż.* skont strateġika kif proposta minn Eskes *et al.*, 2012) (18), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' taħlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju maħsub, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax

▼M8

jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx ivvalutati fi studji ta' validazzjoni (8) (9). Filwaqt li hu konċepibbli li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi jintuża l-metodu ta' ttestjar TER, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata għal mhux aktar minn 24 siegħa fuq l-uċuħ epidermiċi ta' diski ta' ġilda f sistema tat-test b'żewġ kompartimenti fejn id-diski tal-ġilda jaħdmu bħala s-separazzjoni bejn il-kompartimenti. Id-diski tal-ġilda jittieħdu minn firien maqtula b'mod uman ta' età ta' 28-30 jum. Is-sustanzi kimiċi korriżivi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jipproduċu telf ta' integrita normali ta' *stratum corneum* u tal-funzjoni ta' barrjera, li jitkejjel bħala tnaqqis fit-TER 'l isfel minn livell ta' limitu (16) (ara l-paragrafu 32). Għat-TER tal-ġilda tal-firien, intgħażel valur ta' limitu ta' 5kΩ ibbażat fuq *data* estensiva għal varjetà kbira ta' sustanzi fejn il-maġġoranza l-kbira ta' valuri kienu jew sew aktar 'il fuq (spiss > 10 kΩ), jew sew aktar 'l isfel (spiss < 3 kΩ) minn dan il-valur (16). B'mod ġenerali, is-sustanzi kimiċi tat-test li mhumiex korrużivi fl-annimali iżda li huma irritanti jew mhux irritanti ma jnaqqsux it-TER inqas minn dan il-valur ta' limitu. Barra minn hekk, l-użu ta' preparati ta' ġilda oħrajn jew tagħmir ieħor jista' jibdel il-valur ta' limitu, li jeħtieġ aktar validazzjoni.

11. Hu inkorporat fil-proċedura tat-test pass li jorbot iż-żebgħa sabiex isir it-test ta' konferma tar-riżultati pożittivi fit-TER inklużi valuri madwar 5 kΩ. Il-pass li jorbot iż-żebgħa jiddetermina jekk iż-żjieda fil permeabbiltà ionika hijiex minħabba qerda fiżika tal-*istratum corneum*. Il-metodu TER tal-ġilda tal-firien wera li jista' jbassar il-korrużività *in vivo* fil-fenek ivvalutat taħt it-TM B.4 (2).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

12. Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tnax-il Sustanza ta' Profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (16)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1.

Tabella 1

Lista ta' Sustanzi ta' Profiċjenza [1]

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika [2]	GHS tan-NU/ CLP Kat. Ibbażata fuq Riżultati *In Vivo* [3]	VRM Kat. Ibbażata fuq Riżultati *In Vitro*	Stat Fiżiku	pH [4]
Korrużivi *In Vivo*						
N,N'-Dimetil dipropilentriammina	10563-29-8	bażi organika	1A	6 × C	L	8,3
1,2-Diamminopropan	78-90-0	bażi organika	1A	6 × C	L	8,3

▼**M8**

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika ([2])	GHS tan-NU/ CLP Kat. Ibbażata fuq Riżultati *In Vivo* ([3])	VRM Kat. Ibbażata fuq Riżultati *In Vitro*	Stat Fiżiku	pH ([4])
Korrużivi *In Vivo*						
Aċidu sulfuriku (10 %)	7664-93-9	aċidu inorganiku	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
Idrossidu tal-potassju (10 % soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	bażi inorganika	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
Aċidu ottanojku (Kapriliku)	124-07-2	aċidu organiku	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-terz-Butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Non korrużivi *in vivo*						
Aċidu isostearikू	2724-58-5	aċidu organiku	NC	6 × NC	L	3,6
4-Ammino-1,2,4-triażol	584-13-4	bażi organika	NC	6 × NC	S	5,5
Fenetil bromur	103-63-9	elettrofil	NC	6 × NC	L	3,6
4-(Metiltjo)-benżaldeid	3446-89-7	elettrofil	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-Dekadjen	1647-16-1	organiku newtrali	NC	6 × NC	L	3,9
Tetrakloroetilen	127-18-4	organiku newtrali	NC	6 × NC	L	4,5

Abbrevjazzjonijiet: aq = soluzzjoni milwiema; CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; VRM = Metodu ta' Referenza Validat; C = korrużiva; NC = mhux korrużiva.

([1]) Is-sustanzi ta' profiċjenza, imqassma l-ewwel skont il-korrużivi kontra dawk mhux korriżivi, imbagħad skont is-subkategorija tal-korrużivi u mbagħad skont il-klassi kimika, intgħażlu mis-sustanzi użati fl-istudju ta' validazzjoni tal-ECVAM tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien (8) (9). Sakemm ma jkunx indikat mod ieħor, is-sustanzi ġew ittestjati fil-livell ta' purità miksub meta nxtraw minn sors kummerċjali (8). L-għażla, sa fejn possibbli, inkludiet sustanzi li: (i) huma rappreżentattivi tal-firxa ta' risponsi tal-korrużività (*eż.* nonkorrużivi; korrużivi dgħajfa sa b'saħħithom) li l-VRM kapaċi jkejjel jew ibassar; (ii) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudju ta' validazzjoni; (iii) jirriflettu l-karatteristiċi tal-prestazzjoni tal-VRM; (iv) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew; (v) jinduċu riżultati definittivi fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment *in vivo*; (vi) huma kummerċjalment disponibbli; u (vii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.

([2]) Il-klassi kimika assenjata minn Barratt *et al.* (8).

([3]) Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għall-kategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

([4]) Il-valuri tal-pH inkisbu minn Fentem *et al.* (9) u minn Barratt *et al.* (8).

▼M8

PROĊEDURA

13. Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOP) għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda TER tal-ġilda tal-firien huma disponibbli (19). Il-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jikkonformaw mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

Annimali

14. Il-firien għandhom jintużaw għaliex is-sensittività tal-ġilda tagħhom għal sustanzi f'dan il-metodu ta' ttestjar intweriet fl-imgħoddi (12) u huma l-uniku sors ta' ġilda li ġie validat b'mod formali (8) (9). L-età (meta tinġabar il-ġilda) u l-ispeċi tal-far huma partikolarment importanti biex jiġi żgurat li l-follikoli tax-xahar fil-fażi dormanti qabel ma jibda t-tkabbir tax-xahar adult.

15. Ix-xahar dorsali u tal-ġenb minn firien żgħar, ta' età ta' madwar 22 jum (derivati minn Wistar jew fergħa komparabbli), jitneħħa bir-reqqa b'qattiegħ ix-xahar żgħir. Imbagħad l-annimali jiġu maħsula billi jintmesħu bl-attenzjoni, filwaqt li l-parti bix-xagħar maqtugħ tiġi mgħarrqa f'taħlita antibijotika (li pereżempju, li jkun fiha streptomiċina, peniċillina, kloramfenikol, u amfoteriċina, f konċentrazzjonijiet li huma effettivi biex jinibixxu t-tkabbir tal-batterji). L-annimali jerġgħu jiġu maħsula bl-anitibjotiċi fit-tielet jew ir-raba' jum wara l-ewwel ħasla u jintużaw fi żmien tlitt ijiem wara t-tieni ħasla, meta l-*istratum corneum* ikun irkupra mit-tneħħija tax-xahar.

Il-preparazzjoni tad-diski tal-ġilda

16. L-annimali jinqatlu umanament meta jagħlqu 28-30 jum; din l-età hi kritika. Il-ġilda dorso-laterali ta' kull annimal imbagħad titneħħa u jinqatgħalha x-xaħam subkutanju eċċess billi titqaxxar bil-galbu mill-ġilda. Id-diski tal-ġilda, b'djametru ta' madwar 20 mm kull wieħed, jitneħħew. Il-ġilda tista' tiġi maħżuna qabel ma jintużaw id-diski fejn jidher li d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tkun ekwivalenti għal dik miksuba b'ġilda friska.

17. Kull disk tal-ġilda jitqiegħed fuq wieħed mit-truf ta' tubu PTFE (politetrafluworoetilen), li jiżgura li l-wiċċ epidermiku hu f kuntatt mat-tubu. Ċirku "O" tal-gomma jitwaħħal billi jingħafas mat-tarf tat-tubu biex il-ġilda tinżamm f postha u t-tessut żejjed jiġi maqtugħ. Iċ-ċirku "O" tal-ġilda imbagħad jiġi ssiġġillat bir-reqqa mat-tarf tat-tubu PTFE bl-ingwent. It-tubu hu appoġġjat minn molla ġewwa parti reċettorja li fiha taħlita ta' MgSO4 (154 mM) (Figura 1). Id-disk tal-ġilda għandha tiġi għal kollhox meqruda fit-taħlita ta' $MgSO_4$. Minn ġilda ta' far wieħed jistgħu jinkisbu daqs 10 – 15-il disk tal-ġilda. Id-dimensjonijiet tat-tubu u taċ-ċirku "O" jintwerew fil-Figura 2.

18. Qabel ma jibda l-ittestjar, it-TER taż-żewġ diski tal-ġilda jitkejlu bħala proċedura ta' kontroll tal-kwalità għal kull ġilda tal-annimal. Iż-żewġ diski għandhom jagħtu valuri ta' reżistenza elettrika akbar minn 10 kΩ biex jintużaw il-bqija tad-diski għall-metodu ta' ttestjar. Jekk il-valur tar-reżistenza huwa inqas minn 10 kΩ, il-bqija tad-diski minn dik il-ġilda għandha tintrema.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

19. Għandhom jintużaw kontrolli konkorrenti pożittivi u negattivi għal kull sessjoni (esperiment) biex tiġi żgurata l-ħidma xierqa tal-mudell esperimentali. Id-diski tal-ġilda minn annimal wieħed għandhom jintużaw f'kull sessjoni (esperiment). Is-sustanzi kimiċi tat-test tal-kontroll pożittiv jew negattiv suġġeriti huma 10M aċidu idrokloriku u ilma ddistillat, rispettivament.

▼M8

20. Is-sustanzi kimiċi tat-test likwidi (150 µL) huma applikati b'mod uniformi mal-wiċċ epidermiku ġewwa t-tubu. Meta jiġu ttestjati materjali solidi, hu applikat ammont biżżejjed ta' solidu b'mod livell fuq id-disk biex jiġi żgurat li l-wiċċ kollu tal-epidermis hu kopert. Jiżdied l-ilma deioniżżat (150 µL) fuq is-solidu u t-tubu jiġi aġitat bil-mod. Biex jinkiseb il-kuntatt massimu mal-ġilda, is-solidi jistgħu jkunu jridu jissaħħnu sa 30 ° C biex tinħall jew tiġi mrattba s-sustanza kimika tat-test, jew mitħuna biex jipproduċu materjal granurali jew terra.

21. Jintużaw tliet diski tal-ġilda għal kull sustanza kimika tat-test u tal-kontroll f'kull sessjoni ta' ttestjar (esperiment). Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu applikati għal 24 siegħa f'20-23 ° C. Is-sustanza kimika tat-test titneħħa bil-ħasil b'ġett ta' ilma tal-vit f'temperatura li tasal sa dik ambjentali sakemm ma jifdal ebda materjal ieħor li jista' jitneħħa.

Il-kejl tat-TER

22. L-impedenza tal-ġilda titkejjel bħala TER bl-użu ta' Wheatstone bridge b'vultaġġ baxx u kurrent alternanti (18). L-ispeċifikazzjonijiet ġenerali tal-bridge huma vultaġġ operattiv ta' 1-3 Volt, kurrent sinus jew rettangolari alternat ta' 50 - 1 000 Hz, u firxa tal-kejl ta' mhux anqas minn 0,1 – -30 kΩ. Id-databridge użat fl-istudju tal-validazzjoni kejjel l-induttanza, il-kapaċitanza u r-reżistenza sa valuri ta' 2 000 H, 2 000 µF, u 2 MΩ, rispettivament bi frekwenzi ta' 100 Hz jew 1 kHz, bl-użu ta' valuri serje jew paralleli. Għal-għanijiet tal-korrożività tat-TER il-kejl tal-figura hu rrekordjat f reżistenza, bi frekwenzi ta' 100 Hz u bl-użu ta' valuri serje. Qabel ma titkejjel ir-reżistenza elettrika, it-tensjoni tal-wiċċ tal-ġilda titnaqqas billi jiżdied volum suffiċjenti ta' etanol 70 % biex ikopri l-epidermis. Wara ftit sekondi, l-ethanol jitneħħa mit-tubu u mbagħad t-tessut jiġi idratat billi tiżdied soluzzjoni ta' 3 ml $MgSO_4$ (154 mM). L-elettrodi tad-databridge jitqiegħdu fuq kull naħa tad-disk tal-ġilda biex titkejjel ir-reżistenza f kΩ/disk tal-ġilda (Figura 1). Id-dimensjonijiet tal-elettrodi u t-tul tal-elettrodu espost taħt il-klipep tal-kukkudrill jintwerew fil-Figura 2. Il-klipp imqabbda mal-elettrodu intern titqiegħed fuq il-wiċċ tat-tubu PTFE matul il-kejl tar-resistenza, biex ikun żgurat li jiddaħħal tul konsistenti tal-elettrodu fis-soluzzjoni ta' $MgSO_4$. L-elettrodu ta' barra jitqiegħed ġewwa l-kamra riċeventi biex isserraħ fuq il-qiegħ tal-kompartiment. Id-distanza bejn il-molla u l-qiegħ tat-tubu PTFE tinżamm kostanti (Figura 2), għaliex din id-distanza taffettwa l-valur ta' reżistenza miksub. Għalhekk, id-distanza bejn l-elettrodu ta' ġewwa u d-disk tal-ġilda għandha tkun kostanti u minimali (1-2 mm).

23. Jekk il-valur tar-reżistenza mkejjel ikun akbar minn 20 kΩ, dan jista' jkun dovut għall-fdalijiet tas-sustanza kimika tat-test li jiksu l-wiċċ epidermiku tad-disk tal-ġilda. Tista' tiġi ppruvata t-tneħħija ulterjuri ta' din il-kisja, pereżempju, billi t-tubu PTFE jiġi ssiġillat bis-saba' kbir b'ingwanta u jitħawwad għal madwar 10 sekondi; is-soluzzjoni ta' $MgSO_4$ tintrema u jerġa' jsir il-kejl tar-reżistenza b' $MgSO_4$ ġdid.

24. Il-karatteristiċi u d-dimensjonijiet tal-apparat tat-test u l-proċedura tal-esperiment użati jistgħu jinfluwenzaw il-valuri tat-TER miksuba. Il-limitu korrożiv ta' 5 kΩ ġie żviluppat mid-*data* miksuba fl-apparat u fil-proċdura speċifiċi użati f dan il-metodu ta' ttestjar. Jistgħu jgħoddu valuri differenti tal-limitu u tal-kontroll jekk jinbidlu l-kundizzjonijiet tat-test jew jintuża apparat differenti. Għalhekk, hu meħtieġ li jiġu kkalibrati l-metodoloġija u l-valuri tal-limiti tar-reżistenza bl-ittestjar ta' serje ta' Sustanzi ta' Profiċjenza magħżula mis-sustanzi fl-istudju tal-validazzjoni (8) (9), jew minn klassijiet tas-sustanzi kimiċi li jkunu simili għas-sustanzi li jkunu qed jiġu investigati. Sett ta' Sustanzi ta' Profiċjenza xierqa hu identifikat fit-Tabella 1.

▼M8

Metodi ta' Fissazzjoni tal-Kulurant

25. L-esponiment ta' xi materjali mhux korrużivi jista' jirriżulta fi tnaqqis tar-reżistenza 'l isfel mil-limitu ta' 5 kΩ li jippermetti l-mogħdija ta' joni mill-*istratum corneum*, u b'hekk titnaqqas ir-reżistenza elettrika (9). Pereżempju, l-organiċi newtri u s-sustanzi li għandhom karatteristiċi tensjoattivi (inklużi deterġenti, emulsifikanti u tensjoattivi oħrajn) jistgħu jneħħu l-lipidi tal-ġilda b'tali mod li jagħmlu l-barriera aktar permeabbli għall-joni. Għalhekk, jekk il-valuri TER prodotti mit-tali sustanzi kimiċi jkunu anqas minn jew madwar 5 kΩ fin-nuqqas ta' dannu viżwalment perċettibbli tad-diski tal-ġilda, tista' ssir valutazzjoni tal-penetrazzjoni tal-kulurant fuq it-tessuti tal-kontroll u dawk trattati biex jiġi determinat jekk il-valuri tat-TER miksuba kinux ir-riżultat tal-permeabbiltà akbar tal-ġilda, jew tal-korrużjoni tal-ġilda (7) (9). Fil-każ tal-aħħar fejn jinqasam l-*istratum corneum*, il-kulurant sulforodammina B, meta applikat mas-superfiċje tal-ġilda, jippenetra malajr u jtebba' t-tessut ta' taħt. Dan il-kulurant partikolari hu stabbli għal varjetà kbira ta' sustanzi u mhuwiex affettwat mill-proċedura tal-estrazzjoni deskritta hawn taħt.

Applikazzjoni u Tneħħija tal-kulurant Sulforodammina B

26. Wara l-valutazzjoni tat-TER, is-sulfat tal-manjeżju jintrema mit-tubu u l-ġilda tiġi eżaminata bir-reqqa għal dannu ovvju. Jekk ma jkun hemm ebda dannu maġġuri ovvju (*eż.* perforazzjoni), 150 µl ta' dilwizzjoni ta' 10 % (w/v) fl-ilma distillat tal-kulurant sulforodammina B (Aħmar Aċidu 52; C.I. 45100; Numru CAS 3520-42-1), tiġi applikata għall-wiċċ epidermiku ta' kull disk tal-ġilda għal sagħtejn. Dawn id-diski tal-ġilda mbagħad jinħaslu bl-ilma tal-vit sa temperatura ambjentali għal madwar 10 sekondi biex jitneħħa l-kulurant eċċessiv/mhux użat. Kull disk tal-ġilda mbagħad jitneħħa bl-attenzjoni mit-tubu PTFE u jitqiegħed f'kunjett (*eż.* flixkun tal-ħġieġ tax-xintillazzjoni ta' 20 ml) li jkun fih ilma dejonizzat (8 ml). Il-fliexken jiġu aġitati bil-mod għal ħames minuti biex jitneħħa kulurant żejjed mhux użat. Din il-proċedura ta' tlaħliħ imbagħad tiġi ripetuta, u wara dan jitneħħew id-diski tal-ġilda u jitqiegħdu fi fliexken li fihom 5 ml ta' 30 % (w/v) dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) fl-ilma distillat u jiġu inkubati mal-lejl f'temperatura ta' 60 ° C.

27. Wara l-inkubazzjoni, kull disk tal-ġilda jitneħħa u jintrema u l-bqija tas-soluzzjoni tiġi ċċentrifugata għal tmien minuti f'temperatura ta' 21 ° C (forza relattiva ċentrifugali ~175 × g). Kampjun ta' 1 ml tas-supernatant jiġi dilwit 1 f'5 (v/v) [jiġifieri 1 ml + 4 ml] ma' 30 % (w/v) SDS fl-ilma ddistillat. Id-densità ottika (OD) tas-soluzzjoni titkejjel f'565 nm.

Il-kalkolu tal-kontenut tal-kulurant

28. Il-kontenut tal-kulurant sulforodammina B għal kull disk jiġi kkalkolat mill-valuri OD (9) (koeffiċjent ta' estinzjoni molari tal-kulurant sulforodammina B ta' 565 mm = 8,7 × 10^4; piż molekolari = 580). Il-kontenut tal-kulurant jiġi determinat għal kull disk tal-ġilda bl-użu ta' kurva xierqa tal-kalibrazzjoni u l-kontenut medju tal-kulurant imbagħad jiġi kkalkolat għar-repliki.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

29. Ir-riżultati medji tat-TER huma aċċettati jekk il-valuri tal-kontroll pożittiv u negattiv konkorrenti jaqgħu fl-iskali aċċettabbli għall-metodi fil-laboratorju tat-test. L-iskali aċċettabli tar-reżistenza għall-metodoloġija u l-apparat deskritti hawn fuq jingħataw f'din it-tabella li ġejja:

▼**M8**

Kontroll	Sustanza	Medda ta' reżistenza (kΩ)
Pożittiv	10M Aċidu idrokloriku	0,5 - 1,0
Negattiv	Ilma distillat	10 - 25

30. Ir-riżultati medji tal-fissazzjoni tal-kulurant jiġu aċċettati b'kundizzjoni li l-valuri konkorrenti tal-kontroll jaqgħu fil-meded aċċettabbli għall-metodu. Meded aċċettabbli suġġeriti tal-kontenut tal-kulurant għas-sustanzi tal-kontroll għall-metodoloġija u għall-apparat deskritti hawn fuq jingħataw fit-tabella li ġejja:

Kontroll	Sustanza	Medda ta' kontenut tal-kulurant (μg/disk)
Pożittiv	10M Aċidu idrokloriku	40 - 100
Negattiv	Ilma distillat	15 - 35

Interpretazzjoni tar-riżultati

31. Il-valur ta' limitu TER li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test korrużivi minn dawk mhux korrużivi ġie stabbilit matul l-ottimizzazzjoni tal-metodu ta' ttestjar, ittestjat matul fażi ta' prevalidazzjoni, u kkonfermat fi studju ta' validazzjoni formali.

32. Il-mudell ta' tbassir għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda TER tal-ġilda tal-firien (9) (19), assoċjat mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, hu pprovdut hawn taħt:

Is-sustanza kimika tat-test titqies li mhix korrużiva għall-ġilda:

i) jekk il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun akbar minn (>) 5kΩ, jew

ii) il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas jew daqs (≤) 5kΩ, u

— id-diski tal-ġilda ma juru ebda dannu ovvju (*eż.* perforazzjoni), u

— il-kontenut medju ta' kulurant tad-disk jkun anqas (<) mill-kontenut medju ta' kulurant tad-disk tal-kontroll pożittiv 10M Hcl miksub b'mod konkorrenti (ara l-paragrafu 30 għall-valuri tal-kontroll pożittiv).

Is-sustanza kimika tat-test titqies li hi korrużiva għall-ġilda:

i) jekk il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas minn jew daqs (≤) 5 kΩ u d-diski tal-ġilda jkollhom dannu ovvju (eż. perforati), jew

ii) il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas jew daqs (≤) 5kΩ, u

— id-diski tal-ġilda ma juru ebda dannu ovvju (*eż.* perforazzjoni), iżda

▼M8

— il-kontenut medju ta’ kulurant tad-disk jkun akbar (>) mill-kontenut medju ta’ kulurant tad-disk tal-kontroll pożittiv 10M Hcl miksub b’mod konkorrenti (ara l-paragrafu 30 għall-valuri tal-kontroll pożittiv).

33. Sessjoni ta’ ttestjar (esperiment) magħmula minn tal-anqas tliet diski tal-ġilda rreplikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu, f’każijiet ta’ riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew TER medja daqs 5 ± 0,5 kΩ, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni ta’ ttestjar indipendenti (esperiment), kif ukoll it-tielet waħda f’każ ta’ riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet ta’ ttestjar (esperimenti).

DATA U RAPPORTAR

Data

34. Il-valuri tar-reżistenza (kΩ) u l-valuri tal-kontenut tal-kulurant (µg/disk), fejn xieraq, għas-sustanza kimika tat-test, kif ukoll għall-kontrolli pożittivi u negattivi għandhom jiġu rrapportati f’forma tabulari, inkluża d-*data* għal kull disk rreplikat individwali f’kull sessjoni ta’ ttestjar (esperiment) u l-valuri medji ± SD. L-esperimenti ripetuti kollha għandhom jiġu rrapportati. Id-dannu osservat fid-diski tal-ġilda għandu jiġi rrapportat għal kull sustanza kimika tat-test.

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar ’il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tisħin, it-tħin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta’ limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Annimali tat-Test:

— Razza u sess użati;

— L-età tal-annimali meta użati bħala annimali donaturi;

— Is-sors, il-kundizzjoni tal-abitazzjoni, id-dieta, eċċ.;

— Id-dettalji tal-preparazzjoni tal-ġilda.

▼**M8**

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-kurvi tal-kalibrazzjoni għall-apparat tat-test;

— Il-kurvi tal-kalibrazzjoni għat-twettiq tat-test tal-fissazzjoni tal-kulurant, il-band pass użat għall-kejl tal-valuri tal-OD, u l-medda tal-linearità tal-OD tal-apparat tal-kejl (*eż.* spettrofotometru), jekk xieraq;

— Id-dettalji tal-proċedura tat-test użata biex titkejjel it-TER;

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata għall-valutazzjoni tal-fissazzjoni tal-kulurant, jekk xieraq;

— Id-dożi tat-test użati, id-durata tal-perjodu/i tal-esponiment u t-temperatura/i tal-esponiment;

— Dettalji dwar il-proċedura tal-ħasil użata wara l-perjodu tal-esponiment;

— In-numru ta' diski tal-ġilda rreplikati użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (kontroll pożittiv u negattiv);

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

— Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:

  i) Aċċettabbiltà tal-valuri TER tal-kontrolli pożittivi u negattivi (f'kΩ) b'referenza għall-meded tar-reżistenza tal-kontrolli pożittivi u negattivi

  ii) Aċċettabbiltà tal-valuri tal-kontenut tal-kulurant tal-kontrolli pożittivi u negattivi (f'µg/disk) b'referenza għall-meded tal-kontenut tal-kulurant tal-kontrolli pożittivi u negattivi

  iii) Aċċetabbiltà tar-riżultati tat-test b'referenza għall-varjabbiltà storika bejn ir-repliki tad-diski tal-ġilda

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' deċiżjoni/tal-mudell ta' tbassir applikati.

Ir-riżultati:

— Tabulazzjoni tad-*data* mill-assaġġi tat-TER u tal-fissazzjoni tal-kulurant (jekk xieraq) għal sustanzi kimiċi tat-test u għal kontrolli individwali, għal kull sessjoni ta' ttestjar (esperiment) u għal kull replika tad-diski tal-ġilda (annimali individwali u kampjuni tal-ġilda individwali), medji, SDs u CVs;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe effett osservat;

— Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Akuta tal-Ġilda.

(3) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Mudell tal-Ġilda *In Vitro*.

(4) Il-Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.

(5) Il-Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., u Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., u Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., u Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., u Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjentifika tat-Test ta' Reżistenza Elettrika Transkuntanja tal-Ġilda tal-Firien (TER) (Test *In Vitro* għall-Korrużività tal-Ġilda), Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC10), 3 ta' April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼M8

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., u Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., u Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191-194.

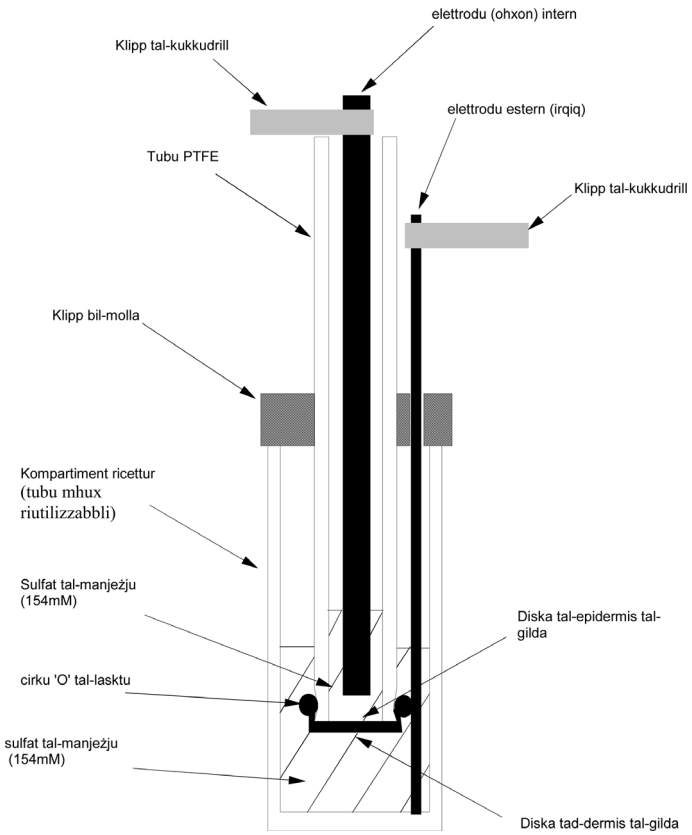
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. u Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (Diċembru 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

Figura 1

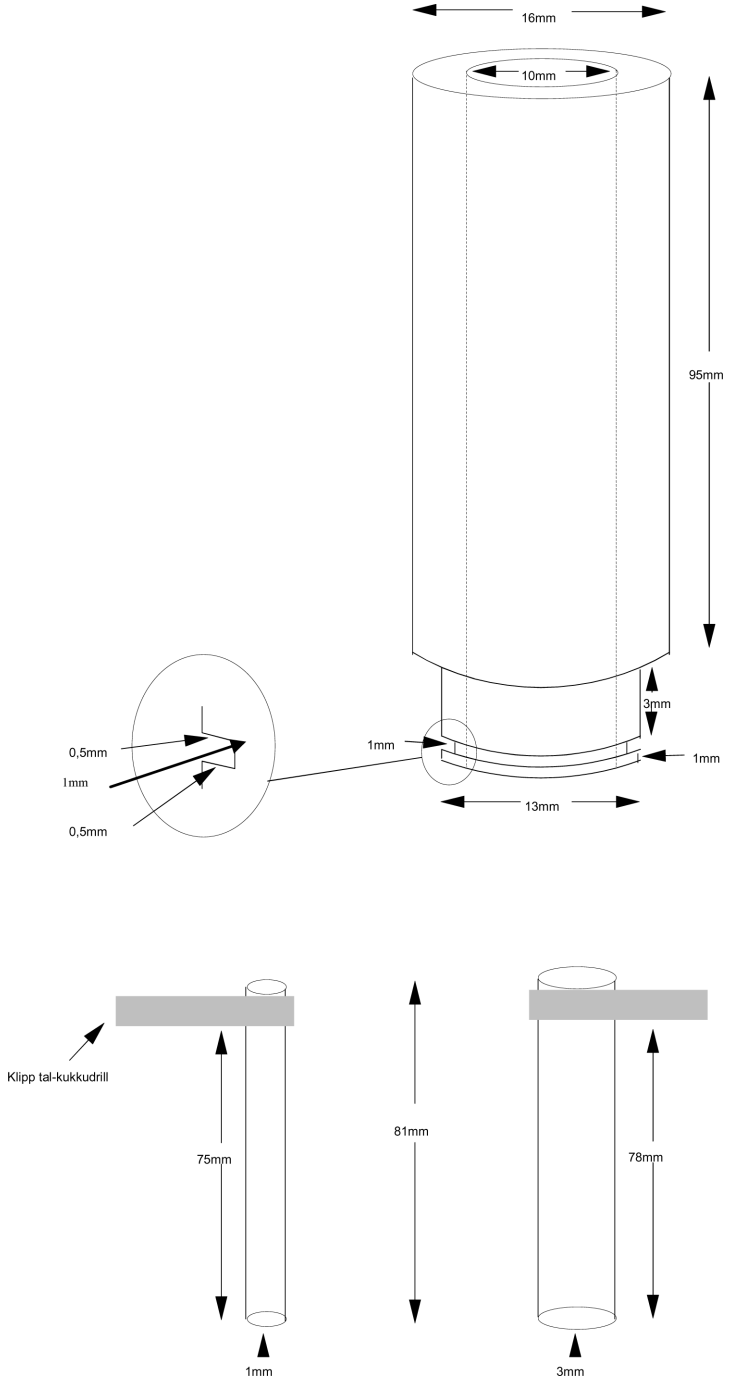
Apparat Għall-Assaġġ Tat-Ter Tal-Ġilda Tal-Firien



▼**M8**

Figura 2

Dimensjonijiet Tat-Tubu Tal-Politetrafluworoetilen (Ptfe) U T-Tubi Reċettorji U L-Elettrodi Użati



Il-fatturi kritiċi tal-apparat muri fuq:

— Id-djametru ġewwieni tat-tubu tal-PTFE,

— It-tul tal-elettrodi relattivi għat-tubu tal-PTFE u t-tubu reċettorju, b'tali mod li d-disk tal-ġilda ma għandux jintmess mill-elettrodi u li tul standard tal-elettrodu hu f'kuntatt mas-soluzzjoni $MgSO_4$;

▼**M8**

— L-ammont tas-soluzzjoni $MgSO_4$ fit-tubu reċettorju għandu jagħti fond ta' likwidu, relattiv għal-livell fit-tubu tal-PTFE, kif muri fil-Figura 1,

— Id-disk tal-ġilda għandu jitwaħħal tajjeb biżżejjed mat-tubu tal-PTFE, b'tali mod li r-reżistenza elettrika tkun kejl veru tal-karatteristiċi tal-ġilda.

▼**M8**

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (20).

C: Korrużiv.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Konkordanza: Kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (20).

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (NU)): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

IATA: Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

NC: Mhux korrużiva.

OD: Densità Ottika.

PC: Kontroll Pożittiv, replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattat b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

▼M8

Standards tal-prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratezza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (20).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (20).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (20).

Korrużjoni tal-ġilda *in vivo*: Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrożi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minħabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopeċja, u ċikatriċi L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (20).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinkludi kull additttiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sessjoni (ta' ttestjar): Sustanza kimika tat-test waħda testjata b'mod konkorrenti f'minimu ta' tliet diski tal-ġilda rreplikati.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER): hi kejl tal-impendenza elettrika tal-ġilda, bħala valur ta' reżistenza f'kilo Ohms. Metodu sempliċi u robust biex tiġi stmata l-funzjoni ta' barrjera bir-rekordjar tal-passaġġ tal-joni mill-ġilda bl-użu ta' apparat Wheatstone bridge.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

▼M8

B.*40bis*. **KORRUŻJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: METODU TA' TTESTJAR TAL-EPIDERMIS UMAN RIKOSTITWIT (RhE)**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 431 tal-OECD (2016). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrożi viżibbli permezz tal-*epidermis* u fid-*dermis*, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1])]. Dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat B.40bis jipprovdi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Jippermetti wkoll subkategorizzazzjoni parzjali tal-korrużivi.

2. Il-valutazzjoni tal-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi tipikament kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju (TM B.4 ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD; oriġinarjament adottata fl-1981 u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) (2). Minbarra l-metodu ta' ttestjar B.40bis preżenti, żewġ metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra għall-ittestjar tal-potenzjal ta' korrużjoni tas-sustanzi kimiċi ġew validati u adottati bħala TM B.40 (ekwivalenti għat-TG 430 tal-OECD) (3) u TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) (4). Barra minn hekk, it-TM B.46 *in vitro* (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD) (5) ġie adottat għall-ittestjar tal-potenzjal ta' irritazzjoni tal-ġilda. Dokument ta' gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (6).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmiem tas-saħħa umana. Jagħmel użu minn *epidermis* uman rikostitwit (RhE) (miksub minn keratinoċiti epidermali mhux trasformati derivati mill-bniedem) li jimita mill-qrib il-proprjetajiet istoloġiċi, morfoloġiċi, bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-partijiet ta' fuq tal-ġilda tal-bniedem, jiġifieri l-*epidermis*. Il-linja gwida korrispondenti tal-OECD oriġinarjament ġiet adottata fl-2004 u aġġornata fl-2013 biex tinkludi metodi ta' ttestjar addizzjonali bl-użu tal-mudelli RhE u l-possibbiltà li jintużaw il-metodi għas-sostenn tas-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi korrużivi, u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tintroduċi l-użu ta' proċedura alternattiva għall-kejl tal-vijabbiltà.

4. F'dan il-metodu ta' ttestjar huma inklużi erba' mudelli RhE kummerċjalment disponibbli. Saru (11) (12) studji ta' prevalidazzjoni (7), segwiti minn studju formali ta' validazzjoni għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda (8)(9)(10) għal tnejn minn dawn il-mudelli tat-test kummerċjalment disponibbli, EpiSkin™ Standard Model (SM) u EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (imsejħa fit-test segwenti bħala l-Metodi ta' Referenza Validat - VRMs). L-eżitu ta' dawn l-istudji wassal għar-rakkomandazzjoni

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

▼M8

li ż-żewġ VRMs imsemmija hawn fuq jistgħu jintużaw għall-finijiet regolatorji ta' distinzjoni ta' sustanzi korrużivi (C) minn sustanzi mhux korrużivi (NC), u li barra minn hekk EpiSkin™ jista' jintuża biex isostni s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi korrużivi (13)(14)(15). Żewġ mudelli oħra tat-test RhE tal-korrużjoni tal-ġilda *in vitro* disponibbli kummerċjalment urew riżultati simili għall-VRM EpiDerm™ skont il-validazzjoni bbażata fuq il-PS (16)(17)(18). Dawn huma SkinEthic™ RHE ([1]) u epiCS® (qabel imsejħa EST-1000) li jistgħu jintużaw ukoll għall-finijiet regolatorji ta' distinzjoni tas-sustanzi korrużivi minn dawk mhux korrużivi (19)(20). L-istudji ta' wara l-validazzjoni mwettqa mill-produtturi tal-mudell tal-RhE fis-snin 2012 sal-2014 bi protokoll irfinut li jikkoreġi interferenzi ta' tnaqqis mhux speċifiku ta' MTT mis-sustanzi kimiċi tat-test tejbu l-prestazzjoni kemm fid-diskriminazzjoni tas-C/NC kif ukoll fis-sostenn tas-subkategorizzazzjoni tal-korrużivi (21)(22). Analiżijiet statistiċi ulterjuri tad-*data* ta' wara l-validazzjoni ġġenerata b'EpiDerm™ SCT, bi SkinEthic™ RHE u b'EpiCS® saru bl-għan li jidentifikaw mudelli ta' tbassir alternattivi li tejbu l-kapaċità ta' tbassir għas-subkategorizzazzjoni (23).

5. Qabel ma metodu ta' ttestjar tal-RhE *in vitro* simili jew modifikat propost għall-korrużjoni tal-ġilda li mhuwiex il-VRMs ikun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex tiġi żgurata s-similarità tiegħu għall-VRMs, skont ir-rekwiżiti tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) (24) stabbiliti skont il-prinċipji tad-dokument ta' gwida Nru 34 tal-OECD (25). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu ta' ttestjar propost ġdid jew aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluż fil-linja gwida tat-test korrispondenti. Il-mudelli tat-test inklużi fil-linja gwida tat-test jistgħu jintużaw biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-riżultati tat-testijiet fuq il-metodu ta' ttestjar *in vitro* għall-korrużjoni tal-ġilda, filwaqt li jibbenefikaw mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data*.

DEFINIZZJONIJIET

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

7. Dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Dan il-metodu ta' ttestjar ikompli jsostni s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi u ta' taħlitiet korrużivi fis-subkategorija fakultattiva 1A, skont il-GHS tan-NU (1), kif ukoll taħlita tas-subkategoriji 1B u 1C (21)(22)(23). Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar hi li ma jippermettix id-diskriminazzjoni bejn is-subkategorija 1B u s-subkategorija 1C tal-korrużivi tal-ġilda skont il-GHS tan-NU u s-CLP minħabba s-sett limitat ta' sustanzi kimiċi korrużivi *in vivo* ferm magħrufa tas-subkategorija 1C. Il-mudelli tat-test EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE u epiCS® jistgħu jiġu subkategorizzati (jiġifieri 1A kontra 1B-u-1C kontra NC)

8. Firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi li primarjament tirrappreżenta sustanzi individwali ġiet ittestjata fil-validazzjoni li ssostni l-mudelli tat-test inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar meta jintużaw għall-identifikazzjoni ta' sustanzi mhux korrużivi u korrużivi; il-bażi ta' *data* empirika tal-istudju ta' validazzjoni kien fiha 60 sustanza kimika li jkopru firxa wiesgħa ta' klassijiet

([1]) L-abbrevjazzjoni RhE (=Epidermis uman Rikostitwit) tintuża għall-mudelli kollha bbażati fuq teknoloġija tal-RhE. L-abbrevjazzjoni RHE kif użata flimkien mal-mudell SkinEthic™ tfisser l-istess, iżda, bħala parti mill-isem ta' dan il-metodu ta' ttestjar speċifiku kif kummerċjalizzat, hi miktuba kollha kemm hi b'ittri kapitali.

▼**M8**

kimiċi (8)(9)(10). L-ittestjar biex jintwerew is-sensittività, l-ispeċifiċità, l-akkuratezza u ir-riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju tal-assaġġ għas-subkategorizzazzjoni sar mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar u r-riżultati ġew rieżaminati mill-OECD (21) (22) (23). Fuq il-bażi tad-*data* ġenerali disponibbli, dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi u ta' stati fiżiċi li jinkludu likwidi, semisolidi, solidi u xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu mitħuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda trattament preċedenti ieħor tal-kampjun. F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-mudelli tat-test inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' sustanzi kimiċi tat-test, dawn ma għandhomx jintużaw għal dik il-kategorija speċifika ta' sustanzi kimiċi tat-test. Barra minn hekk, dan il-metodu ta' ttestjar hu prežunt bħala applikabbli għal taħlitiet bħala estensjoni tal-applikabbiltà tiegħu għas-sustanzi. Madankollu, minħabba l-fatt li t-taħlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-taħlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' taħlitiet (*eż.* skont strateġika kif proposta f'(26)), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' taħlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx ivvalutati fi studji ta' validazzjoni (8)(9)(10). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

9. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejlijiet tal-vijabbiltà tat-tessut u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet. It-tip ta' kontrolli adattati li jistgħu jkunu meħtieġa se jvarja skont it-tip ta' interferenza prodotta mis-sustanza kimika tat-test u l-proċedura użata biex jitkejjel MTT formażan (ara l-paragrafi 25-31).

10. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-saħħa u hu bbażat fuq l-istess sistema tat-test tal-RhE, bl-użu ta' protokoll ieħor (5). Għal evalwazzjoni sħiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermali wieħed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (6). Dan l-approċċ tal-IATA jinkludi t-twettiq ta' testijiet *in vitro* għall-korrożjoni tal-ġilda (bħal kif deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar) u l-irritazzjoni tal-ġilda qabel ma jitqies l-ittestjar fl-annimali ħajjin. Hu rikonoxxut li l-użu ta' ġilda umana hu soġġett għal konsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, ifformata minn keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-*epidermis* uman, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermis* uman. Din tikkonsisti f'saff tal-qiegħ, f'saff spinuż u f'saff granulari organizzati, u fi *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellolari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analogu għal dawk li jinstabu *in vivo*.

▼M8

12. Il-metodu ta’ ttestjar tal-RhE hu bbażat fuq il-premessa li s-sustanzi kimiċi korruživi jistgħu jinfdu l-*istratum corneum* permezz tad-diffużjoni jew tal-erożjoni, u huma ċitotossiċi għaċ-ċelloli li jinsabu fis-saffi ta’ taħt. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli titkejjel b’konverżjoni enzimatika tal-kulurant vitali MTT [bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5- difeniltetrażolju, bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil; Numru CAS 298-93-1], f’melħ tal-formażan blu li jitkejjel b’mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (27). Is-sustanzi kimiċi korruživi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà taċ-ċelloli taħt il-livelli limitu definiti (ara l-paragrafi 35 u 36). Il-metodu ta’ ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda bbażat fuq l-RhE wera li jbassar effetti tal-korrużjoni tal-ġilda *in vivo* vvalutati fil-fniek skont it-TM B.4 (2).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

13. Qabel l-użu ta’ rutina ta’ kwalunkwe wieħed mill-erba’ metodi ta’ ttestjar validati tal-RhE li jaderixxu ma’ dan il-metodu ta’ ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tnax-il Sustanza ta’ Profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. Fil-każ ta’ użu ta’ metodu għas-subklassifikazzjoni, għandha tintwera s-subkategorizzazzjoni korretta wkoll. F’sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista’ tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta’ riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta’ sustanzi kimiċi ta’ riferiment (24)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1.

Tabella 1

Lista ta’ Sustanzi ta’ Profiċjenza [1]

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika [2]	Kat. tal-GHS tan-NU/ tas-CLP fuq il-bażi tar-riżultati *In Vivo* [3]	VRM Kat. Ibbażata fuq riżultati [4] *In Vitro*	Riduċent tal-MTT [5]	Stat Fiżiku
Korruživi *In Vivo* tas-Subkategorija 1A						
Aċidu bromoaċetiku	79-08-3	Aċidu organiku	1A	(3) 1A	—	S
Diidrat tat-trifluworur tal-Boron	13319-75-0	Aċidi inorganiċi	1A	(3) 1A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	S
Klorur tad-Dikloroaċetil	79-36-7	Elettrofil	1A	(3) 1A	—	L
Taħlita ta’ Korruživi *In Vivo* tas-subkategoriji 1B u 1C						
Monoidrat tal-aċidu gliossiliku	563-96-2	Aċidu organiku	1B-u-1C	(3) 1B-u-1C	—	S
Aċidu lattiku	598-82-3	Aċidu organiku	1B-u-1C	(3) 1B-u-1C	—	L
Etanolammina	141-43-5	Bażi organika	1B)	(3) 1B-u-1C	Y	Viskuż

▼**M8**

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika (2)	Kat. tal-GHS tan-NU/ tas-CLP fuq il-bażi tar-riżultati *In Vivo* (3)	VRM Kat. Ibbażata fuq riżultati (4) *In Vitro*	Riduċent tal-MTT (5)	Stat Fiżiku
Korrużivi *In Vivo* tas-Subkategorija 1A						
Aċidu idrokloriku (14,4 %)	7647-01-0	Aċidi inorganiċi	1B-u-1C	(3) 1B-u-1C	—	L
Mhux korrużivi *In Vivo*						
Bromur tal-fenetil	103-63-9	Elettrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-Amino-1,2,4-triażol	584-13-4	Bażi organika	NC	(3) NC	—	S
4-(metiltjo)-benżaldeid	3446-89-7	Elettrofil	NC	(3) NC	Y	L
Aċidu lawriku	143-07-7	Aċidu organiku	NC	(3) NC	—	S

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; VRM = Metodu ta' Referenza Validat; NC = mhux korrużiva; I = iva; S = solidu; L= likwidu

(1) Is-sustanzi ta' profiċjenza, imqassma l-ewwel bil-korrużivi kontra l-mhux korrużivi, u mbagħad skont is-subkategorija ta' korrużivi u mbagħad skont il-klassi kimika, intgħażlu mis-sustanzi użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-ECVAM ta' EpiSkin™ u ta' EpiDerm™ (8) (9) (10) u mill-istudji ta' wara l-validazzjoni fuq il-bażi ta' *data* pprovduta mill-iżviluppaturi ta' EpiSkin™ (22), ta' EpiDerm™, ta' SkinEthic™ u ta' epiCS®(23). Sakemm ma jkunx indikat mod ieħor, is-sustanzi ġew ittestjati fil-livell ta' purità miksub meta nxtraw minn sors kummerċjali (8) (10). L-għażla, sa fejn possibbli, tinkludi sustanzi li: (i) huma rappreżentattivi tal-firxa ta' risponsi tal-korrużività (eż. non korrużivi; korrużivi dgħajfa sa b'saħħithom) li l-VRMs kapaċi jkejlu jew ibassru; (ii) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudji ta' validazzjoni; (iii) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew; (iv) jinduċu riżultati riproduċibbli fil-VRM; (v) jinduċu riżultati definittivi fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment *in vivo*; (vi) huma kummerċjalment disponibbli; u (vii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.

(2) Il-klassi kimika assenjata minn Barratt *et al.* (8).

(3) Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għall-kategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

(4) It-tbassiriet *in vitro* tal-VRM rapprotati f'din it-tabella nkisbu bil-mudelli tat-test (VRMs) ta' EpiSkin™ u ta' EpiDerm™ matul l-ittestjar ta' wara l-validazzjoni mwettaq mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar.

(5) Il-valuri tal-vijabbiltà miksuba fl-Istudji ta' Validazzjoni tal-Korrużjoni tal-ġilda tal-ECVAM ma ġewx ikkoreġuti għat-tnaqqis dirett tal-MTT (il-kontrolli maqtula ma sarux fl-istudji tal-validazzjoni). Madankollu, id-*data* ta' wara l-validazzjoni ġenerata mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar li hi ppreżentata f'din it-tabella nkisbet b'kontrolli adattati (23).

14. Bħala parti mill-eżerċizzju tal-profiċjenza, hu rrakkomandat li l-utent jivverifika l-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-manifattur tal-mudell tal-RhE. Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu ta' ttestjar ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun intweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu ta' ttestjar b'rutina, hu rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

PROĊEDURA

15. Din li ġejja hi deskrizzjoni ġenerika tal-komponenti u tal-proċeduri tal-mudelli tat-test tal-RhE għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar. Il-mudelli tal-RhE approvati bħala xjentifikament validi għall-użu fi ħdan dan il-metodu ta' ttestjar, jiġifieri l-mudelli EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE u epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), jistgħu jinkisbu minn sorsi kummerċjali. Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOPs) għal dawn l-erba' mudelli tal-RhE huma disponibbli (34)(35)(36)(37), u l-komponenti ewlenin tal-metodu

▼M8

ta' ttestjar tagħhom huma miġbura fil-qosor fl-Appendiċi 2. Hu rakkomandat li l-SOP rilevanti tiġi kkonsultata matul l-implimentazzjoni u l-użu ta' wieħed minn dawn il-mudelli fil-laboratorju. L-ittestjar bl-erba' mudelli tat-test tal-RhE b'dan il-metodu ta' ttestjar għandu jikkonforma mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHE

Kundizzjonijiet Ġenerali

16. Keratinoċiti umani mhux trasformati għandhom jintużaw biex jerġgħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegħ, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taħt *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali biex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi, pereżempju d-dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika referenzjarja tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment meħtieġ sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50 % (ET_{50}) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika referenzjarja b'konċentrazzjoni speċifika u fissa (ara l-paragrafu 18). Il-karatteristiċi ta' tażżin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-*istratum corneum* għat-tessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun ħieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

Kundizzjonijiet Funzjonali

Vijabbiltà

17. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà tat-tessut hu l-assaġġ MTT (27). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhE jnaqqsu l-MTT tal-kulurant vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). L-OD tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri OD < 0,1. L-MTT formażan estratt jista' jiġi kwantifikat bl-użu ta' kejl tal-assorbanza standard (OD) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (38). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom jiżguraw li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Meded tal-aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-erba' mudelli tat-test tal-RhE validati inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar huma mogħtija fit-Tabella 2. Utent tal-Ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv huma stabbli fil-koltura (jipprovdu kejl tal-OD simili) sakemm idum il-perjodu ta' esponiment.

Tabella 2

Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-kontroll tal-kwalità tal-lott

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Funzjoni ta' protezzjoni

18. L-*istratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed biex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida ta' ċerti sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi (*eż*. SDS jew Triton X-100), kif stmat minn IC_{50} jew ET_{50} (Tabella 3). Il-funzjoni ta' protezzjoni ta' kull lott tal-mudell tal-RhE użat għandha tintwera mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-mudell tal-RhE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 21).

Morfoloġija

19. L-eżaminazzjoni istoloġika tal-mudell tal-RhE għandha ssir billi tintwera struttura qisha *epidermis* uman b'diversi saffi li jkun fiha *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* u *stratum corneum* u turi profil lipidu simili għall-profil lipidu tal-epidermis uman. Eżaminazzjoni istoloġika ta' kull lott tal-mudell tal-RhE użat li turi morfoloġija xierqa tat-tessuti għandha tiġi pprovduta mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-mudell tal-RhE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 21).

Riproduċibbiltà

20. L-utenti tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà tal-metodi ta' ttestjar maż-żmien bil-kontrolli pożittivi u negattivi. Barra minn hekk, il-metodu ta' ttestjar għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur tal-mudell tal-RhE jipprovdi *data* li turi r-riproduċibbiltà maż-żmien b'sustanzi kimiċi korrużivi u mhux korrużivi, pereżempju, mil-lista tas-Sustanzi ta' Profiċjenza (Tabella 1). Fil-każ ta' użu ta' metodu ta' ttestjar għas-subkategorizzazzjoni, ir-riproduċibbiltà fir-rigward tas-subkategorizzazzjoni għandha tintwera wkoll.

Kontroll tal-kwalità (QC)

21. Il-mudell tal-RhE għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-*vijabbiltà* (paragrafu 17), il-*funzjoni ta' protezzjoni* (paragrafu 18) u l-*morfoloġija* (paragrafu 19) huma l-aktar rilevanti. Din id-*data* tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar, biex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Huma biss dawk ir-riżultati prodotti b'lottijiet ta' tessuti aċċettati bi QC li jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli tal-klassifikazzjoni korrużiva. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-IC50 jew għall-ET50 tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Il-meded tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tat-test validati jingħataw fit-Tabella 3.

Tabella 3

Kriterji tal-QC għar-rilaxx tal-lottijiet

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiSkin™ (SM) (trattament ta' 18 -il siegħa b' SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 sigħat	ET50 = 8,7 sigħat
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 sigħat	ET50 = 10,0 sigħat
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 sigħat	ET50 = 7,0 sigħat

▼M8

Applikazzjoni tas-Sustanza Kimika tat-Test u tas-Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

22. Tal-anqas għandhom jintużaw żewġ repliki tat-tessuti għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli għal kull ħin tal-esponiment. Għas-sustanzi kimiċi likwidi kif ukoll għas-sustanzi kimiċi solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test sabiex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-epidermis filwaqt li tiġi evitata doża infinita, jiġifieri għandu jintuża minimu ta' 70 µl/cm^2 jew 30 mg/cm^2. Skont il-mudelli, il-wiċċ tal-epidermis għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi solidi, biex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u l-wiċċ tal-epidermis (34)(35)(36)(37). Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. Il-metodu ta' applikazzjoni għandu jkun xieraq għas-sustanza kimika tat-test (ara pereżempju r-referenzi (34-37). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinħasel bir-reqqa mill-*epidermis* b'bafer milwiem, jew b'0,9 % NaCl. Skont liema jintuża mill-erba' mudelli tat-test validati tal-RhE, jintużaw żewġ jew tliet perjodi ta' esponiment għal kull sustanza kimika tat-test (għall-erba' mudelli validi kollha tal-RhE: tliet minuti u sieħa; għal EpiSkin™ esponiment addizzjonali ta' erba' sigħat). Skont il-mudell tat-test tal-RhE użat u l-perjodu ta' esponiment ivvalutat, it-temperatura ta' inkubazzjoni matul l-esponiment tista' tvarja bejn it-temperatura ambjentali u 37 °C.

23. F'kull sessjoni għandhom jintużaw kontrolli negattivi (NC) u pożittivi (PC) konkorrenti biex jintwera li l-vijabbiltà (bil-kontrolli negattivi), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessuti li tirriżulta (bil-PC) jinsabu fi ħdan medda ta' aċċettazzjoni storika definita. Is-sustanzi kimiċi tal-PC suġġeriti huma aċidu aċetetiku glaċjali jew 8N KOH skont il-mudell tal-RhE użat. Ta' min jinnota li 8N KOH hu riduċent dirett tal-MTT li jista' jeħtieġ kontrolli adattati kif deskritti fil-paragrafi 25 u 26. Il-kontrolli negattivi suġġeriti huma 0,9 % (w/v) NaCl jew ilma.

Kejlijiet tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

24. L-analiżi tal-MTT, li hi assaġġ kwantitattiv, għandha tintuża biex titkejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli skont dan il-metodu ta' ttestjar (27). Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni tal-MTT b'konċentrazzjoni xierqa (0,3 jew 1 mg/ml) għal 3 sigħat. Imbagħad il-prodott preċipitat formażan blu jiġi estratt mit-tessuti permezz ta' solvent (e.g., isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażan titkejjel billi tiġi determinata l-OD f'570 nm permezz ta' filter band pass sa massimu ta' ±30 nm, jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafi 30 u 31)(38).

25. Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT, jew bi tnaqqis dirett tal-MTT fi blu formażan, u/jew b'interferenza tal-kulur jekk is-sustanza kimika tat-test tassorbi, b'mod naturali jew minħabba l-proċeduri ta' trattament, fl-istess medda tal-OD ta' formażan (570 ± 30 nm, primarjament sustanzi kimiċi blu u vjola). Għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex tiġi individwata u kkoreġuta interferenza potenzjali minn dawn is-sustanzi kimiċi tat-test bħall-kontroll tat-tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) u l-kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC) (ara l-paragrafi 26 sa 30). Dan hu partikolarment importanti meta sustanza kimika speċifika tat-test ma titneħħiex għalkollox mit-tessut bit-tlaħliħ jew meta din tippenetra l-*epidermis*, u għalhekk tkun preżenti fit-tessuti meta jitwettaq it-test tal-vijabbiltà tal-MTT. Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs għall-mudelli tat-test (34)(35)(36)(37).

▼**M8**

26. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tiżdied ma' medium tal-MTT preparata ġdida (34) (35) (36) (37). Jekk it-taħlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod dirett l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq l-epidermis mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali tħaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu s-sustanza kimika tat-test f'ammont simili bħal tessuti vijabbli. Kull sustanza kimika li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula għal kull ħin tal-esponiment, li jsirilhom it-test tal-korrużjoni tal-ġilda sħiħ. Imbagħad, il-vijabbiltà tat-tessuti veru tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għar-riduċent tal-MTT nieqes it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess riduċent tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSMTT).

27. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti jew mis-sustanzi kimiċi tat-test li jitlewnu meta jidħlu f'kuntatt mal-ilma jew mal-isopropanol u tittieħed deċiżjoni dwar il-ħtieġa ta' kontrolli addizzjonali, għandha ssir analiżi spettrali tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma (ambjent matul l-esponiment) u/jew fl-isopropanol (soluzzjoni tal-estrazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi d-dawl fil-medda ta' 570 ± 30 nm, għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-kolorant jew inkella għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 30 u 31). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test imlewna li tinterferixxi tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli għal kull ħin ta' esponiment, lijsirilhom it-test sħiħ tal-korrużjoni tal-ġilda iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC_{living}). Il-kontroll tal-NSC_{living} irid jitwettaq fl-istess ħin għal kull ħin tal-esponiment għal kull sustanza kimika tat-test ikkulurita (f'kull sessjoni) minħabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT nieqes il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC_{living}).

28. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 26) u interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 27) se jkunu jeħtieġu t-tielet sett ta' kontrolli wkoll, minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC_{living} deskritti fil-paragrafi ta' qabel, meta jitwettaq il-kejl tal-assorbanza standard (OD). Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti skuri li jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT (eż. blu, vjola, suwed) minħabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 26. Dawn is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jitgħaqqdu kemm ma' tessuti ħajjin kif ukoll ma' dawk maqtula u, għalhekk, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test, iżda anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC_{living} diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSCkilled). F'dan il-kontroll addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula għal kull ħin tal-esponiment, li

▼M8

ssirilhom il-proċedura tal-ittestjar sħiħa iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC_{killed} wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa, iżda għandu jsir fl-istess ħin mal-kontroll tal-NSMTT u, fejn possibbli, bl-istess lott ta' tessuti. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT nieqes il-$\%NSC_{living}$ flimkien mal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut ($\%NSC_{killed}$).

29. Ta' min jinnota li t-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku u l-interferenzi tal-kulur mhux speċifiku jistgħu jżidu l-kejl tal-estratt tat-tessut f'livell ogħla mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-ba¿i, kull laboratorju għandu jiddetermina l-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru tiegħu bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7) minn sors kummerċjali qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji. B'mod partikolari, il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu tal-ispettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur meta l-ODs tal-estratti tat-tessuti miksuba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal tnaqqis dirett tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi ħdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru jew meta l-vijabbiltà perċentwali mhux ikkoreġuta miksuba bis-sustanza kimika tat-test diġà tkun iddefinietha bħala korrużiva (ara l-paragrafi 35 u 36). Minkejja dan, ir-riżultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew $\%NSC_{liVing} > 50$ % tal-kontroll negattiv għandhom jittieħdu bil-galbu.

30. Għal sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti li ma jkunux kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) minħabba interferenza qawwija wisq mal-assaġġ MTT, tista' titħaddem il-proċedura alternattiva tal-ispettrofotometrija HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafu 31) (37). Is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika tat-test qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (38). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC_{liVing} jew tal-NSC_{killed} qatt ma jkunu meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta waħda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas b'mod dirett l-MTT jew ikollha kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità ta' tnaqqis dirett tal-MTT (kif deskritt fil-paragrafu 26). Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT,il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT li jistgħu jkunu interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal Ods (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-ogħla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma jistgħux jiġu vvalutati, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħħu f'sitwazzjonijiet rari ħafna biss.

▼M8

31. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża wkoll bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażan MTT (38). Minħabba d-diversità tas-sistemi tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' dawk deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bijoanalitiċi (38)(39). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 4. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 4, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażan MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

32. Għal kull metodu ta' ttestjar li juża mudelli validi tal-RhE, it-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandhom jesibixxu OD li tirrifletti l-kwalità tat-tessuti kif deskritta fit-tabella 2 u ma għandhomx ikunu anqas mil-limiti storikament stabbiliti. Tessuti trattati bil-PC, jiġifieri aċidu aċetiku glaċjali jew 8N KOH, għandhom jirriflettu l-ħila tat-tessuti li jirrispondu għal sustanza kimika korrużiva fil-kundizzjonijiet tal-mudell tat-test (ara l-Appendiċi 2). Il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti tas-sustanza kimika tat-test u/jew tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll għandha taqa' fi ħdan il-limiti aċċettati għal kull rekwiżit validu tal-mudell tal-RhE (ara l-Appendiċi 2) (*eż.* id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %). Jekk il-kontroll negattiv jew il-PC inkluż f'sessjoni jaqa' barra mill-meded aċċettati, is-sessjoni titqies li mhix kwalifikata u għandha tiġi ripetuta. Jekk il-varjabbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test taqa' barra mill-medda definita, l-ittestjar tagħha għandu jerġa' jsir.

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u tat-Tbassir

33. Il-valuri tal-OD miksuba għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jintużaw biex jiġi kkalkolat il-perċentwal tal-vijabbiltà relattiva għall-kontroll negattiv, li hi stabbilita għal 100 %. F'każ li tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Il-valuri perċentwali ta' limitu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli li jiddistingwu sustanza kimika tat-test korrużiva minn waħda mhux korrużiva (jew li jiddiskriminaw bejn subkategoriji korrużivi differenti) huma definiti hawn taħt fil-paragrafi 35 u 36 għal kull wieħed mill-mudelli tat-testijiet koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar u għandhom jintużaw għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

34. Sessjoni waħda ta' ttestjar magħmula minn tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni li tirriżulta tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti, tista' tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

35. Il-mudell ta' tbassir għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni EpiSkin™ (9)(34)(22), assoċjat mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, hu muri fit-Tabella 4:

▼**M8**

Tabella 4

Mudell ta' tbassir EpiSkin™

Il-vijabbiltà mkejla wara l-punti tal-ħin tal-esponiment (t=3, 60 u 240 minuta)	It-tbassir li għandu jiġi kkunsidrat
< 35 % wara esponiment ta' 3 min	**Korrużivi:** • Subkategorija fakultattiva 1A (*)
≥ 35 % wara esponiment ta' 3 min **U** < 35 % wara esponiment ta' 60 min **JEW** ≥ 35 % wara esponiment ta' 60 min **U** < 35 % wara esponiment ta' 240 min	**Korrużivi:** • Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B-u-1C
≥ 35 % wara esponiment ta' 240 min	**Mhux korrużivi**

(*) Skont id-*data* ġġenerata fid-dawl tal-valutazzjoni tal-utilità tal-mudelli ta' ttestjar tal-RhE għas-sostenn tas-subkategorizzazzjoni, intwera li madwar 22 % tar-riżultati tas-subkategorija 1A tal-mudell tat-test EpiSkin™ jistgħu fil-fatt jikkostitwixxu sustanzi/taħlitiet tas-subkategorija 1B jew tas-subkategorija 1C (jiġifieri sovraklassifikazzjonijiet) (ara l-Appendiċi 3).

36. Il-mudelli ta' tbassir għall-mudelli ta' ttestjar għall-korrużjoni tal-ġilda EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36), u epiCS® (16)(23)(37) assoċjati mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, huma murija fit-Tabella 5:

Tabella 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE u epiCS®

Il-vijabbiltà mkejla wara l-punti tal-ħin tal-esponiment (t=360 minuta)	It-tbassir li għandu jiġi kkunsidrat
STADJU 1 għal EpiDerm™ SCT, għal SkinEthic™ RHE u għal epiCS®	
< 50 % wara esponiment ta' 3 min	Korrużiv
≥ 50 % wara esponiment ta' 3 min **U** < 15 % wara esponiment ta' 60 min	Korrużiv
≥ 50 % wara esponiment ta' 3 min **U** ≥ 15 % wara esponiment ta' 60 min	Mhux korrużivi
STADJU 2 għal EpiDerm™ SCT - għal sustanzi/taħlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1	
< 25 % wara esponiment ta' 3 min	Subkategorija fakultattiva 1A *
≥ 25 % wara esponiment ta' 3 min	Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C
STADJU 2 għal SkinEthic™ RHE - għal sustanzi/taħlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1	
< 18 % wara esponiment ta' 3 min	Subkategorija fakultattiva 1A *

▼M8

Il-vijabbiltà mkejla wara l-punti tal-ħin tal-esponiment (t=360 minuta)	It-tbassir li għandu jiġi kkunsidrat
STADJU 1 għal EpiDerm™ SCT, għal SkinEthic™ RHE u għal epiCS®	
≥ 18 % wara esponiment ta' 3 min	Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C
STADJU 2 għal epiCS® - għal sustanzi/taħlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1	
< 15 % wara esponiment ta' 3 min	Subkategorija fakultattiva 1A *
≥ 15 % wara esponiment ta' 3 min	Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C

DATA U RAPPORTAR

Data

37. Għal kull test, id-*data* minn repliki tat-tessuti individwali (*eż.* valuri tal-OD u *data* dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-*data* minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rapportati l-medji u l-meded tal-vijabbiltà u s-CVs bejn ir-repliki tat-tessuti għal kull test. Interazzjonijiet osservati bir-reaġent MTT b'riduċenti diretti tal-MTT jew b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti għandhom jiġu rapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

Rapport tat-test

38. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u kwalunkwe proprjetà fiżikokimika rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tisħin, it-tħin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Il-mudell u l-protokoll tal-RhE użati u l-ħsieb warajhom (jekk applikabbli)

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-mudell tal-RhE użat (inkluż in-numru tal-lott);

▼**M8**

— Informazzjoni dwar il-kalibrazzjoni għall-apparat tal-kejl (*eż.* spettrofotometru), it-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl;

— Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT;

— Deskrizzjoni tal-kwantifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, jekk applikabbli;

— Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:

i) Il-vijabbiltà;

ii) Il-funzjoni ta' protezzjoni;

iii) Il-morfoloġija;

iv) Ir-riproduċibbiltà u l-kapaċità ta' tbassir;

v) Il-kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell;

— Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma tkunx limitata għall-aċċettabbiltà tad-data tal-QC b'referenza għad-data tal-lottijiet storiċi;

— Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza.

Proċedura tat-Test:

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata (inklużi l-proċeduri ta' ħasil użati wara l-perjodu ta' esponiment);

— Doża tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll użati;

— Id-durata tal-perjodu/i tal-esponiment u t-temperatura/i tal-esponiment;

— Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur, jekk applikabbli;

— In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (PC, kontroll negattiv, u NSMTT, NSCliving u NSCkilled, jekk applikabbli), għal kull ħin tal-esponiment;

— Deskrizzjoni tal-kriterji tad-deċiżjonijiet/tal-mudell tat-tbassir applikati fuq il-bażi tal-mudell tal-RhE użat;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test (inklużi l-proċeduri tal-ħasil).

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test:

— Il-valuri medji tal-kontrolli pożittivi u negattivi u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika;

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;

▼**M8**

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test.

Ir-riżultati:

— Tabultazzjoni tad-*data* għal sustanzi kimiċi tat-test u għal kontrolli individwali, għal kull perjodu ta' esponiment, kull sessjoni u kull kejl tar-repliki inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti, id-differenzi bejn ir-repliki, l-SDs u/jew is-CVs jekk applikabbli;

— Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, %NSCliving, % NSCkilled, id-differenzi bejn ir-repliki tat-tessuti, l-SDs u/jew is-CVs (jekk applikabbli), u l-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessuti;

— Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bis-sustanzi kimiċi tal-kontroll b'rabta mas-sessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

— Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) NU (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, NU New York u Ġinevra. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermali Akuta.

(3) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*.

(4) Il-Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.

(5) Il-Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., u Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., u Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

▼**M8**

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., u Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. u Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. u Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Trijangolu Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjenetifika tat-Test EpiSkin™ (Test *In Vitro* għall-Korrużività tal-Ġilda), Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC10), 3 ta' April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Mudell tal-Ġilda Umana EpiDerm™ għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC14), 21 ta' Marzu 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. u Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., u Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. u Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Mudell tal-Ġilda Umana SkinEthic™ għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC25), 17 ta' Novembru 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). Dikjarazzjoni tal-ESAC dwar il-Validità Xjentifika ta' Metodu ta' Ttestjar *In-Vitro* għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda: l-EST-1000, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC30), 12 ta' Ġunju 2009.

▼**M8**

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., u Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., u Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro.* Fi: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M u Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. u Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J u Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. u Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS u Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF u Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (Diċembru 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (Frar 2012). Verżjoni MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (Jannar 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (Jannar 2012). Verżjoni 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., u McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)-based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (Mejju 2001). Disponibbli fuq: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼M8

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (25).

Vijabbiltà taċ-ċelloli: Il-parametru li jkejjel l-attività sħiħa tal-popolazzjoni ċellulari *eż*. il-kapaċità tad-deidroġenaži mitokondrijali ċellulari biex titnaqqas is-sustanza koloranti vitali MTT ([bromur tat-3-(4,5-Dimetiltijażol l-2-il)-2,5-difeniltetrażolju, blu Tijażolil;), li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, jikkorrispondi għall-għadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Konkordanza: Dan hu kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (25).

ET_{50}: Jista' jiġi stmat bid-determinazzjoni tal-ħin tal-esponiment meħtieġ biex il-vijabbiltà taċ-ċelloli titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika ta' riferiment f'konċentrazzjoni speċifikata fissa, ara wkoll IC_{50}.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

HPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja.

IATA: Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

IC_{50}: Tista' tiġi stmata bid-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, ara wkoll ET_{50}.

Doża infinita: Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-*epidermis* lil hinn mill-ammont meħtieġ biex tinkesa b'mod sħiħ u uniformi s-superfiċje tal-*epidermis*. **Taħlita:** Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar li fiha ma jirreaġixxux.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

MTT: Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

▼M8

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni > 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

NC: Mhux korrużiva.

Kontroll tal-NSC_{killed}: Kontroll tal-Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

Kontroll tal-NSC_{living}: Kontroll tal-Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti ħajjin.

NSMTT: Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

OD: Densità Ottika

PC: Kontroll Pożittiv, Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza kimika li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Standards tal-prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratezza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (25).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (25).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (25).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' PC.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (25).

Korrużjoni tal-ġilda in vivo: Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrożi viżibbli mill-*epidermis* u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minħabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopeċja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

▼**M8**

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (25).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull additttiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Ħafna.

UVCB: sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

▼M8

Appendiċi 2

KOMPONENTI EWLENIN TAL-MUDELLI TAT-TEST TAL-RHE VALIDATI GĦALL-ITTESTJAR TAL-KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

Komponenti tal-Mudell tat-Test	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Superfiċje tal-mudell	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Numru ta' repliki tat-tessuti	Tal-anqas 2 għal kull ħin tal-esponiment	Tal-anqas 2-3 għal kull ħin tal-esponiment	Tal-anqas 2 għal kull ħin tal-esponiment	Tal-anqas 2 għal kull ħin tal-esponiment
Doża u applikazzjoni tat-trattament	Likwidi u viskuża: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Solidi: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl soluzzjoni NaCl (9 g/l) Tax-xama'/iweħħlu: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) b'xibka tan-najlon	Likwidi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) b'xibka tan-najlon jew mingħajr *Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon* Semisolidi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Solidi: 25 µl H\CORPUSHT TYPE="-SUB">2\CORPUS/HT>O (jew aktar jekk ikun hemm bżonn) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Xama': biċċa ċatta "forma ta' diska" b'dijametru ta' madwar 8 mm imqiegħda fuq it-tessut imxarrab bi 15-il µl H_2O.	Likwidi u viskuża: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) bl-użu ta' xibka tan-najlon *Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon* Solidi: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Tax-xama'/iweħħlu: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) bl-użu ta' xibka tan-najlon	Likwidi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) bl-użu ta' xibka tan-najlon *Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon* Semisolidi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Solidi: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (jew aktar jekk ikun hemm bżonn) Tax-xama': biċċa ċatta "forma ta' cookie" b'dijametru ta' madwar 8 mm imqiegħda fuq it-tessut imxarrab bi 15-il µl H_2O
Kontroll ta' qabel għat-tnaqqis dirett tal-MTT	50 µl (likwidi) jew 20 mg (solidi)+ 2 ml MTT soluzzjoni ta' 0,3 mg/ml għal 180 ± 5 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma	50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi)+ 1 ml MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża	40 µl (likwidi) jew 20 mg (solidi)+ 1 ml MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 180± 15-il min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża	50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi)+ 1 ml MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża

▼M8

Komponenti tal-Mudell tat-Test	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Kontroll ta' qabel għall-interferenza tal-kulur	10 µl (likwidi) jew 10 mg (solidi) + 90 µl H_2O mħallta għal 15-il min f'RT → jekk is-soluzzjoni tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin	50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi) + 300 µl H_2O għal 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin	40 µl (likwidi) jew 20mg (solidi) + 300 µl H_2O mħallta għal 60 min f'RT → jekk is-sustanza kimika tat-test tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin	50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi) + 300 µl H_2O għal 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin
Ħin u temperatura tal-esponiment	3 min, 60 min (± 5 min) u 240 min (± 10 min) F'armarju ventilat Temperatura Ambjentali (RT, 18-28°C)	3 min f'RT, u 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min f'RT, u 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min f'RT, u 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Tlaħliħ	25 ml 1x PBS (2 ml/xeħta)	20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS	20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS	20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS
Kontroll negattiv	50 µl soluzzjoni NaCl (9 g/l) Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment	50 µl H_2O Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment	40 µl H_2O Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment	50 µl H_2O Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment
Kontroll pożittiv	50 µl Aċidu aċetiku glaċjali Ittestjat għal 4 sigħat biss	50 µl 8N KOH Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment	40 µl 8N KOH Ittestjat għal siegħa (1) biss	50 µl 8N KOH Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment
Soluzzjoni tal-MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Ħin u temperatura tal-inkubazzjoni tal-MTT	180 min (± 15-il min) f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15-il min) f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH

▼M8

Komponenti tal-Mudell tat-Test	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Solvent ta' estrazzjoni	500 µl isopropanol aċidifikat (0,04 N HCl fl-isopropanol) (tessut iżolat mgħaddas għalkollox)	2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)	1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)	2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)
Ħin u temperatura tal-estrazzjoni	Matul il-lejl f'RT, bi protezzjoni mid-dawl	Matul il-lejl mingħajr tħawwid f'RT jew għal 120 min bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT	Matul il-lejl mingħajr tħawwid f'RT jew għal 120 min bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT	Matul il-lejl mingħajr tħawwid f'RT jew għal 120 min bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT
Qari tal-OD	570 nm (545 - 595 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	570 nm (jew 540 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	570 nm (540 - 600 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	540 - 570 nm mingħajr filtru ta' riferiment
Kontroll tal-Kwalità tat-Tessuti	trattament ta' 18-il siegħa b'SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Trattament b'1 % Triton X-100 4,08 sigħat ≤ ET_{50} ≤ 8,7 sigħat	Trattament b'1 % Triton X-100 4,0 sigħat ≤ ET_{50} ≤ 10,0 sigħat	Trattament b'1 % Triton X-100 2,0 sigħat ≤ ET_{50} ≤ 7,0 sigħat
Kriterji ta' Aċċettabbiltà	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (NaC1) għandha tkun ≥ 0,6 u ≤ 1,5 għal kull ħin tal-esponiment 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 4 sigħat bil-kontroll pożittiv (aċidu aċetiku glaċjali), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun ≤ 20 % 3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs ≥ 0,3, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H_2O) għandha tkun ≥ 0,8 u ≤ 2,8 għal kull ħin tal-esponiment 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 15 % 3. Fil-medda ta' 20 - 100 % vijabbiltà, il-Koeffiċjent ta' Varjazzjoni (CV) bejn ir-repliki tat-tessuti għandha tkun ta' ≤ 30 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H_2O) għandha tkun ≥ 0,8 u ≤ 3,0 għal kull ħin tal-esponiment 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) (u 4 sigħat, jekk applikabbli) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 15 % 3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs ≥ 0,3, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H_2O) għandha tkun ≥ 0,8 u ≤ 2,8 għal kull ħin tal-esponiment 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 20 % 3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs ≥ 0,3, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %

▼**M8**

Appendiċi 3

PRESTAZZJONI TAL-MUDELLI TAT-TEST GĦAS-SUBKATEGORIZZAZZJONI

It-tabella ta' hawn taħt tipprovdi l-prestazzjoni tal-erba' mudelli tat-test ikkalkolati fuq il-bażi ta' sett ta' 80 sustanza kimika ttestjati mill-erba' żviluppaturi tat-test. Il-kalkoli saru mis-Segretarjat tal-OECD, u ġew rieżaminati u miftiehma minn subgrupp ta' esperti (21) (23).

Il-mudelli tat-test EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ u epiCS® jistgħu jiġu subkategorizzati (jiġifieri 1A kontra 1B-u-1C kontra NC)

Il-prestazzjonijiet, ir-rati ta' sovraklassifikazzjoni, ir-rati ta' sottoklassifikazzjoni, u l-preċiżjoni (Kapaċità ta' tbassir) tal-erba' mudelli tat-test fuq il-bażi ta' sett ta' 80 sustanza kimika lkoll ittestjati fuq żewġ jew tliet sessjonijiet f'kull mudell tat-test:

STATISTIKI DWAR IT-TBASSIRIET MIKSUBA FUQ IS-SETT SHIH TA' SUSTANZI KIMIĊI

(n = 80 sustanza kimika ttestjati fuq żewġ sessjonijiet indipendenti għal epiCS® jew tliet sessjonijiet indipendenti għal EpiDerm™ SCT, għal EpiSkin™ u għal SkinEthic™ RHE, jiġifieri rispettivament 159 (*) jew 240 klassifikazzjoni)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Sovraklassifikazzjonijiet:				
1B-u-1C 1A sovraklassifikati	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
1B-u-1C sovraklassifikati NC	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
1A sovraklassifikati NC	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Korr. sovraklassifikata	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Rata globali ta' sovraklassifikazzjoni (il-kategoriji kollha)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Sottoklassifikazzjonijiet:				
1A 1B-u-1C sottoklassifikati	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A NC sottoklassifikati	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
NC sottoklassifikati 1B-u-1C	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Rata globali ta' sottoklassifikazzjoni (il-kategoriji kollha)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Klassifikazzjonijiet Korretti:				
1A klassifikati kif suppost	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B-u-/1C klassifikati kif suppost	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC klassifikati kif suppost	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Preċiżjoni Ġenerali	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Mhux korrużivi

(*) sustanza kimika minnhom ġiet ittestjata darba f'epiCS® minħabba ebda disponibbiltà (23)

▼**M8**

Appendiċi 4

PARAMETRI EWLENIN U KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI GĦALL-KWALIFIKAZZJONI TA' SISTEMA TAL-ISPETTROFOTOMETRU TA' HPLC/UPLC GĦALL-KEJL TAL-FORMAŻAN MTT ESTRATT MIT-TESSUT TAL-RHE

Parametru	Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (37)(38)	Kriterji tal-Aċċettazzjoni
Selettività	Analiżi tal-isopropanol, inbjank ħaj (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE ħajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE maqtula mingħajr ebda trattament)	$Area_{interference} \leq 20$ % ta' $Area_{LLOQ}$ ([1])
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità (jiġifieri formażan MTT f'1,6 μg/ml, 16 μg/ml u 160 μg/ml) fl-isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Effett tal-Matriċi	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=5)	85 % ≤ Effett tal-Matriċi % ≤ 115 %
Riport	Analiżi tal-isopropanol wara $ULOQ^2$ ([2]) standard	$Area_{interference} \leq 20$ % tal-$Area_{LLOQ}$
Riproduċibbiltà (dakinhar)	3 kurvi ta' kalibrazzjoni indipendenti (fuq il-bażi ta' 6 dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekuttivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jiġifieri 200 μg/ml); Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	Kurvi ta' Kalibrazzjoni: %Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ Kontrolli tal-Kwalità: %Dev ≤ 15 % u CV ≤ 15 %
Riproduċibbiltà (bejn ġranet differenti)	Jum 1: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 2: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 3: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)	
Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' ħżin f'temperatura ambjentali	%Dev ≤ 15 %
Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE, jekk meħtieġa	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' ħżin f'temperatura speċifikata (eż. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jiġifieri 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi, jiġifieri 200 μg/ml.

▼B

B.41. IT-TEST TAL-FOTOTOSSIĊITÀ *IN VITRO* 3T3 NRU

1. METODU

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 432 (2004).

1.1. DAĦLA

Il-fototossiċità hija definita bħala reazzjoni tossika minn sustanza applikata fuq il-ġisem li hija miġbuda jew miżjuda (apparenti f'livelli ta' doži aktar baxxi) wara l-espożizzjoni sussegwenti għad-dawl, jew li hija indotta mill-irradjazzjoni tal-ġilda wara amministrazzjoni sistemika ta' sustanza.

It-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU jintuża biex jiġi identifikat il-potenzjal fototossiku ta' sustanza tat-test indotta mill-kimika eċċitata wara l-espożizzjoni għad-dawl. It-test jevalwa l-foto-ċitotossiċità bit-tnaqqis relattiv fil-vijabbiltà taċ-ċelloli esposti għall-kimika fil-preżenza kontra n-nuqqas tad-dawl. Is-sustanzi identifikati minn dan it-test x'aktarx ikunu fototossiċi *in vivo* wara applikazzjoni sistemika u tixrid mal-ġilda, jew wara applikazzjoni topikali.

Bosta tipi ta' kimiċi ġew irrapportati li jinduċu l-effetti fototossiċi (1)(2)(3)(4). Il-karatteristika komuni tagħhom hija l-abilità tagħhom li jassorbu l-enerġija tad-dawl fil-firxa tad-dawl tax-xemx. Skond l-ewwel liġi tal-fotokimika (il-Liġi ta' Grotthaus-Draper), il-fotoreazzjoni teħtieġ assorbiment suffiċjenti ta' ammonti ta' dawl. Għalhekk qabel ma jitqies l-ittestjar bioloġiku, spettru ta' l-assorbiment UV/vis tal-kimika tat-test għandu jiġi ddeterminat skond il-Linja Gwida tat-Test 101 ta' l-OECD. Ġie ssuġġerit li jekk il-koeffiċjent ta' l-estinzjoni/assorbiment molari huwa inqas minn 10 litru x mol-1 x cm-1 x'aktarx li l-kimika mhijiex fotoreattiva. Din il-kimika tista' ma teħtieġx li tiġi ttestjata fit-test *in vitro* 3T3 NRU tal-fototossiċità jew kwalunkwe test ieħor bioloġiku għall-effetti avversi fotokimiċi (1)(5). Ara wkoll l-Anness 1.

L-affidabbiltà u r-rilevanza tat-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU ġew evalwati dan laħħar (6)(7)(8) (9). It-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU intwera li jbassar l-effetti ta' fototossiċità akuta fl-annimali u fl-umani *in vivo*. It-test mhuwiex diżinjat li jbassar effetti avversi oħrajn li jistgħu jirriżultaw minn azzjoni kkombinata ta' kimika u d-dawl, eż. ma jindirizzax il-fotoġenotossiċità, il-fotoallerġija, jew il-fotokarċinoġeniċità, u lanqas ma jippermetti stima tas-saħħa tal-fototossiċità. Barra minn dan, it-test ma ġiex diżinjat li jindirizza l-mekkaniżmi indiretti tal-fototossiċità, l-effetti tal-metaboliti tas-sustanza tat-test, jew l-effetti tat-taħlitiet.

Billi l-użu tas-sistemi metabolizzanti huwa rekwiżit ġenerali għat-testijiet kollha *in vitro* għall-basra ta' potenzjal ġenotossiku jew karċinoġeniku, s'issa, fil-każ tal-fototossikoloġija, hemm biss eżempji rari fejn it-trasformazzjoni metabolika hija meħtieġa biex il-kimika taġixxi bħala fototissinu *in vivo* jew *in vitro*. Għalhekk, la jitqies meħtieġ u lanqas xjentifikament ġustifikat li dan it-test isir b'sistema ta' attivazzjoni metabolika.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Irradjanza: fl-intensità ta' inċident tad-dawl ultravjola (UV) jew ta' dawl viżibbli fuq wiċċ, imkejjel f'W/m^2 or mW/cm^2.

Doża ta' dawl: il-kwantità (= intensità × ħin) ta' radjazzjoni ultravjola (UV) jew viżibbli fuq wiċċ, espresso f'Joules (= W × s) għal kull arja tal-wiċċ, eż. J/m^2 jew J/cm^2.

Wavebands tad-Dawl UV: l-indikazzjonijiet rakkomandati mis-CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) huma: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) u UVC (100-280 nm). Indikazzjonijiet oħrajn jintużaw ukoll; id-diviżjoni bejn UVB u UVA spiss titqiegħed bħala 320 nm, u l-UVA tista' tinqasam f'UV-A1 u UV-A2 u jsir qsim f'madwar 340 nm.

Il-vijabilità taċ-ċelloli: parametru li jkejjel l-attività totali ta' popolazzjoni ta' ċelloli (eż. l-użu taż-żebħa vitali Aħmar Newtrali fil-liżożomi ċellulari), li, skond il-punt tat-tmiem imkejjel u d-diżinn tat-test użat, tikkorrelata ma' l-għadd totali u/jew il-vitalità taċ-ċelloli.

Il-vijabilità taċ-ċelloli relattiva: il-vijabilità taċ-ċelloli espressa b'relazzjoni mal-kontrolli solventi (negattivi) li ntużaw fil-proċedura sħiħa tat-test (jew +Irr jew -Irr) iżda mhux ittrattati bil-kimika tat-test.

PIF (*Photo-Irritation-Factor* – Fattur tal-Foto-Irritazzjoni): fattur iġġenerat bit-tqabbil ta' żewġ konċentrazzjonijiet effettivi ndaqs (IC_{50}) tal-kimika tat-test miksuba fin-nuqqas (-Irr) u fil-preżenza (+Irr) ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika b'dawl UVA/vis.

IC_{50}: il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test li biha l-vijabilità taċ-ċelloli titnaqqas b'50 %.

MPE (*Mean-Photo-Effect* – Foto-Effett-Medju): kejl derivat mill-analiżi matematika tal-kurvi tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni miksuba fin-nuqqas (-Irr) u fil-preżenza (+Irr) ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika bid-dawk UVA/vis.

Fototossiċità: reazzjoni tossika akuta li hija eliċitata wara l-ewwel espożizzjoni tal-ġilda ma' xi kimika u l-espożizzjoni sussegwenti għad-dawl, jew li hija indotta b'mod simili mill-irradjazzjoni tal-ġilda wara l-amministrazzjoni sistemika ta' kimika.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU huwa bbażat fuq paragun taċ-ċitotossiċità ta' kimika meta tiġi ttestjata fil-preżenza u fin-nuqqas ta' espożizzjoni għal doża mhux ċitotossika ta' dawl tax-xemx simulata. Iċ-ċitotossiċità f'dan it-test hija espressa bħal tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni ta' l-użu taż-żebgħa vitali Aħmar Newtrali meta mkejjel 24 siegħa wara t-trattament bil-kimika tat-test u l-irradjazzjoni (10). L-Aħmar Newtrali huwa żebgħa katjonika dgħajfa li tippenetra t-tessut taċ-ċelloli malajr bin-nuqqas ta' diffiżjoni, u takkumula b'mod interċellolari fil-liżożomi. L-alterazzjonijiet tal-wiċċ tat-tessut sensittiv liżożomali jwasslu għall-fraġilità liżożomali u tibdil ieħor li gradwalment isiru irriversibbli. Dan it-tibdil ikkaġunat mill-azzjoni tax-xenobjotiċi jirriżulta f'użu u rbit mnaqqsa ta' l-Aħmar Newtrali. Għalhekk huwa possibbli li ssir distinzjoni bejn iċ-ċelloli vijabbli, dawk danneġġjati u dawk mejtin, li huwa l-bażi ta' dan it-test.

▼B

Iċ-ċelloli Balb/c 3T3 jinżammu f'kultura għal 24 siegħa għall-formazzjoni ta' monosaffi. Imbagħad żewġ plattini 96-well għal kull kimika tat-test jiġi pre-inkubati bi tmien konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test għal siegħa. Wara dan, waħda miż-żewġ plattini hija esposta għall-ogħla doża ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika filwaqt li l-plattina l-oħra tinżamm fid-dlam. Fiż-żewġ plattini il-mezz tat-trattament huwa sostitwit mill-mezz tal-kultura u wara 24 siegħa oħra ta' inkubazzjoni, il-vijabilità taċ-ċelloli hija ddeterminata bl-użu ta' l-Aħmar Newtrali. Il-vijabilità taċ-ċelloli hija espressa bħala persentaġġ tal-kontrolli tas-solvent mhux ittrattati u hija kkalkolata għal kull konċentrazzjoni tat-test. Biex jitbassar il-potenzjal fototossiku, ir-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni huma mqabbla, normalment fil-livell ta' l-IC_{50}, jiġifieri l-konċentrazzjoni li tnaqqas il-vijabilità taċ-ċelloli għal 50 % meta mqabbel mal-kontrolli mhux ittrattati.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **Il-preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Iċ-ċelloli*

Linja permanenti tal-fibroblast taċ-ċelloli tal-ġrieden, Balb/c 3T3, klonu 31, jew mill-American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, Stati Uniti, jew mill-European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Renju Unit, intużat fl-istudju tal-validazzjoni, u għalhekk huwa rakkomandat il-ksib minn depożitarju taċ-ċelloli kkwalifikat sew. Ċelloli jew linji taċ-ċelloli oħrajn jistgħu jintużaw bl-istess proċedura tat-test jekk il-kundizzjonijiet tal-kultura huma adattati għall-bżonnijiet speċifiċi taċ-ċelloli, iżda l-ekwivalenza għandha tintwera.

Iċ-ċelloli għandhom jiġu ċċekkjati b'mod regolari għan-nuqqas tal-kontaminazzjoni tal-mikoplażma u jintużaw biss jekk ma tinstabx kontaminazzjoni (11).

Huwa importanti li s-sensittività għall-UV taċ-ċelloli hija vverifikata b'mod regolari skond il-proċedura tal-kontroll tal-kwalità deskritta f'dan il-metodu. Minħabba li s-sensittività taċ-ċelloli għall-UVA tista' tiżdied bin-numru ta' passaġġi, għandhom jintużaw ċelloli Balb/c 3T3 tan-numru l-aktar baxx ta' passaġġi possibbli li jista' jinkiseb, preferibbilment inqas minn 100 (ara t-taqsima 1.4.2.2.2 u l-Anness 2).

1.4.1.2. *Il-kundizzjonijiet tal-mezzi u tal-kultura*

Għandhom jintużaw mezzi tal-kultura u kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni xierqa għall-passaġġ rutin taċ-ċelloli u matul il-proċedura tat-test, eż. għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 dawn huma DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplimentati b'10 % seru ta' l-għoġol għadu jitwieled, 4 mM glutamina, peniċillina (100 IU), u *streptomycin* (100 µg/mL), u inkubazzjoni umidifikata f'temperatura ta' 37 °C, 5-7,5 % CO_2 skond il-*buffer* (ara t-taqsima 1.4.1.4, tieni paragrafu.). Huwa ta' importanza partikolari li l-kundizzjonijiet tal-kultura taċ-ċelloli jiżguraw ħin taċ-ċiklu taċ-ċelloli fil-firxa normali storika taċ-ċelloli jew tal-linja taċ-ċelloli użati.

1.4.1.3. *Il-preparazzjoni tal-kulturi*

Iċ-ċelloli minn kulturi ta' ħażniet iffriżati huma miżrugħa f'mezz tal-kultura ta' densità approssimata u subkulturati għall-inqas darba qabel ma jintużaw fit-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU.

▼B

Iċ-ċelloli użati għat-test tal-fototossiċità jinżergħu fid-densitàż xierqa sabiex il-kulturi ma jilħqux konfluwenza sa l-aħħar tat-test, jiġifieri meta l-vijabilità hija ddeterminata 48 siegħa wara ż-żriegħ taċ-ċelloli. Għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 imkabbra fi plattini 96-well, id-densità rrakkomandata taż-żriegħ taċ-ċelloli hija ta' 1 x 10^4 ċelloli għal kull well.

Għal kull test iċ-ċelloli kimiċi jiġu miżrugħa b'mod identiku f'żewġ plattini separati 96-well, li mbagħad jitgħaddew b'mod konkorrenti mill-proċedura sħiħa tat-test taħt kundizzjonijiet ta' kultura identiċi ħlief għat-terminu sħiħ meta waħda mill-plattini tiġi irradjata (+Irr) u l-oħra tinżamm fid-dlam (-Irr).

1.4.1.4. *Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test*

Is-sustanzi tat-test għandhom jiġu ppreparati friski, immedjatament qabel l-użu kemm-il darba d-data ma turix l-istabilità tagħhom meta huma maħżuna. Huwa rrakkomandat li l-immaniġġjar kimiku kollu u t-trattament inizzjali taċ-ċelloli jsiru taħt kundizzjonijiet tad-dawl li jevitaw il-fotoattivazzjoni jew id-degradazzjoni tas-sustanza tat-test qabel l-irradjazzjoni.

Il-kimiċi tat-test għandhom jinħallu f'taħlitiet ta' mluħ *buffered*, eż. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), jew taħlitiet *buffer* oħrajn fiżjoloġikament ibbilanċjati, li għandhom ikunu ħelsin minn komponenti ta' proteini, komponenti li jassorbu d-dawl (eż. kuluri li jindikaw il-pH u vitamini) sabiex tiġi evitata l-interferenza matul l-irradjazzjoni. Ladarba matul l-irradjazzjoni ċ-ċelloli jinżammu għal madwar 50 minuta barra mill-inkubatur ta' CO_2, għandu jkun hemm attenzjoni li tiġi evitata l-alkalizzazzjoni. Jekk jintużaw *buffers* dgħajfin bħall-EBSS dan jista' jinkiseb billi ċ- ċelloli jiġu inkubati f'7,5 % CO_2. Jekk iċ-ċelloli jiġu inkubati f'5 % CO_2 biss, għandu jingħażel *buffer* aktar qawwi.

Il-kimiċi tat-test ta' solubbiltà limitata fl-ilma għandhom jinħallu f'solvent xieraq. Jekk jintuża solvent, dan għandu jkun preżenti f'volum kostanti fil-kulturi kollha, jiġifieri fil-kontrolli negattivi (solventi) kif ukoll fil-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test, u għandhom ikunu mhux ċitotossiċi f'dik il-konċentrazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test għandhom jingħażlu sabiex jiġu evitati taħlitiet preċipitati jew imsaħħbin.

Dimethylsulphoxide (DMSO) u l-etanol (ETOH) huma s-solventi rrakkomandati. Jistgħu jkunu xierqa solventi oħrajn ta' ċitotossiċità baxxa. Qabel ma jintużaw, is-solventi kollha għandhom jiġu stmati għal karatteristiċi xierqa, eż. reazzjoni mal-kimika tat-test, tnaqqis ta' l-effett fototossiku, proprjetajiet *scavenging* radikali u/jew stabilità kimika fis-solvent.

It-taħlit fil-vortiċi u/jew is-sonikazzjoni u/jew it-tisħin sa temperatura xierqa jistgħu jintużaw biex tiġu mgħejuna s-solubilazzjoni kemm-il darba dan ma jaffettwax l-istabilità tal-kimika tat-test.

▼B

1.4.1.5. *Il-Kundizzjonijiet ta' l-Irradjazzjoni*

1.4.1.5.1. L-għajn tad-dawl

L-għażla ta' għajn xieraq u ta' filtri tad-dawl huwa fattur kruċjali fl-ittestjar tal-fototossiċità. Id-dawl ta' l-UVA u tar-reġjuni viżibbli normalment huwa normalment assoċjat mar-reazzjonijiet fototossiċi *in vivo* (3)(12), filwaqt li ġeneralment il-UVB huwa inqas rilevanti iżda huwa ċitotossiku ħafna; iċ-ċitotossiċità tiżdied 1 000-darba għaliex il-*wavelength* jinbidel minn 313 għal 280 nm (13). Il-kriterji għall-għażla ta' l-għajn tad-dawl xieraq għandhom jinkludu r-rekwiżit li l-għajd tad-dawl jagħti *wavelengths* assorbiti mill-kimika tat-test (spettru ta' l-assorbiment) u li d-doża tad-dawl (li tista' tinkiseb f'ħin ta' espożizzjoni raġonevoli) għandha tkun suffiċjenti biex jinżammu l-kimiċi magħrufin li huma fotoċitotossiċi. Barra minn dan, il-*wavelengths* u d-dożi m'għandhomx ikunu ta' ħsara żejda għas-sistema tat-test, eż. l-emissjoni tas-sħana (ir-reġjun ta' l-infra-aħmar).

Is-simulazzjoni tad-dawl tax-xemx bis-simulaturi tax-xemx titqies li hija l-għajn ta' dawl artifiċjali ottimali. Id-distribuzzjoni ta' l-enerġija ta' l-irradjazzjoni tas-simulatur tax-xemx iffiltrat għandha tkun qrib dik tad-dawl tal-ġurnata barra mogħtija f'(14). Kemm l-arki ta' Xenon u arki ta' alid ta' merkurju-metall *(doped)* jintużaw bħala simulaturi tax-xemx (15). Ta' l-aħħar għandu l-vantaġġ li jagħti inqas sħana u huwa irħas, iżda kemm jaqbel mad-dawl tax-xemx huwa inqas perfett meta mqabbel ma' dak ta' l-arki tax-xenon. Minħabba li s-simulaturi kollha tax-xemx jagħtu kwantitajiet ta' UVB sinjifikanti għandhom ikunu ffiltrati biex inaqqasu l- *wavelengths* ta l-UVB li huma ċitotossiċi ħafna. Minħabba li l-materjali tal-plastik tal-kultura taċ-ċelloli fihom stabbilizzanti tal-UV l-ispettru għandu jiġi mkejjel bl-istess tip ta' għatu tal-plattina ta' 96-well li se jintuża fl-analiżi. Irrispettivament mill-miżuri meħuda biex partijiet mill-ispettru jiġu mnaqqsa bl-iffiltrar jew b'effetti inevitabbli ta' filtru tat-tagħmir, l-ispettru rrekordjat 'l isfel minn dawn il-filtri m'għandhomx jiddevjaw mid-dawl tal-ġurnata barra standardizzat (14). Eżempju tad-distribuzzjoni ta' l-irradjanza spettrali tas-simulatur tax-xemx iffiltrat użat fl-istudju tal-validazzjoni tat-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU jingħata f'(8)(16). Ara wkoll l-Anness 2 Figura 1.

1.4.1.5.2 Id-Dożimetrija

L-intensità tad-dawl (irradjanza) għandha tiġi ċċekkjata b'mod regolari qabel kull test tal-fototossiċità bl-użu ta' miter ta' l-UV xieraq tal-broadband. L-intensità għandha titkejjel bl-istess tip ta' għatu tal-plattina ta' 96-well li se jintuża fl-analiżi. Il-miter ta' l-UV għandu jkun ġie kkalibrat għall-għajn. Il-ħidma tal-miter ta' l-UV għandha tiġi ċċekkjata, u għal dan l-għan l-użu ta' miter ta' l-UV ieħor, ta' riferenza, ta' l-istess tip u ta' kalibrazzjoni identika huwa rrakkomandat. Idealment, f'intervalli akbar, għandu jintuża spettroradjometru biex titkejjel l-irradjanza spettrali ta' l-għajn tad-dawl iffiltrat u biex tiġi ċċekkjata l-kalibrazzjoni tal-miter ta' l-UV tal-broadband.

Doża ta' 5 J/cm^2 (kif imkejjel fil-firxa ta' l-UVA) ġiet determinata li mhijiex ċitotossika għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 u li hija qawwija biżżejjet biex teċċita lill-kimiċi biex jeliċitaw reazzjonijiet fototossiċi, (6) (17) eż. biex jinkiseb 5 J/cm^2 f'perjodu ta' żmien ta' 50 min, l-irradjanza ġiet aġġustata għal 1,7 mW/cm^2. Ara l-Anness 2 Figura 2. Jekk tintuża linja oħra ta' ċelloli jew għajn ta' dawl differenti, id-doża ta' l-irradjazzjoni tista' tkun trid tiġi kkalibrata sabiex jista' jingħażel reġimen tad-doża li ma jagħmilx ħsara liċ-ċelloli iżda li hija biżżejjed biex teċċita fototossini standard. Il-ħin ta' l-espożizzjoni għad-dawk huwa kkalkolat b'dan il-mod:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{Doża ta irradjazzjoni (J /cm}^2) \times 1000}{\text{irradjanza (mW /cm}^2) \times 60} \quad (1\text{J} = 1\ \text{Wsec})$$

1.4.2 **Il-kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1 *Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test*

Il-firxiet tal-konċentrazzjonijiet ta' kimika ttestjata fil-preżenza (+Irr) u fin-nuqqas (-Irr) tad-dawl għandhom jiġu ddeterminati b'mod xieraq f'analiżijiet tas-sejba tal-firxa tad-doża. Jista' jkun utli li s-solubbiltà tiġi smtata fil-bidu u fis-60 min (jew kwalunkwe ħin ta' trattament huwa meħtieġ), għaliex is-solubbiltà tista' tinbidel maż-żmien jew matul l-espożizzjoni. Biex tiġi evitata t-tossiċità indotta minn kundizzjonijiet ta' kultura mhux xierqa jew minn kimiċi ta' aċidità jew alkalinità għolja, il-pH tal-kulturi taċ-ċelloli biż-żjieda tal-kimika tat-test għandu jkun fil-firxa 6,5 – 7,8.

L-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun ġewwa l-kundizzjonijiet fiżjoloġiċi tat-test, eż. għandhom jiġu evitati l-istress ożmotiku u dak tal-pH. Skond il-kimika tat-test, jista' jkun meħtieġ li jitqiesu karatteristiċi oħrajn fiżiċi-kimiċi bħala fatturi li jillimitaw logħla konċentrazzjoni tat-test. Għal sustanzi relattivament insolubbli li mhumiex tossiċi f'konċentrazzjonijiet sal-punt tas-saturazzjoni, l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb għandha tiġi ttestjata. B'mod ġenerali, il-preċipitazzjoni tal-kimika tat-test fi kwalunkwe mill-konċentrazzjonijiet tat-test għandha tiġi evitata. Il-konċentrazzjoni massima ta' sustanza tat-test m'għandhiex teċċedi 1 000 μg/mL; l-ożmolarità m'għandhiex teċċedi 10 mmolar. Għandu jintuża serje ta' taħlit ġeometriku ta' 8 konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test b'fattur kostanti tat-taħlit (ara t-taqsima 2.1, tieni paragrafu).

Jekk hemm informazzjoni (minn esperiment għas-sejba tal-firxiet) li l-kimika tat-test mhijiex ċitotossika sal-konċentrazzjoni tal-limitu fl-esperiment fid-dlam (-Irr), iżda hija ċitotossika ħafna meta tiġi irradjata (+Irr), il-firxiet tal-konċentrazzjoni li għandhom jingħażlu għall-esperiment jistgħu jkunu differenti minn dawk magħżula għall-esperiment (–Irr) biex jintlaħaq ir-rekwiżit tal-kwalità xierqa tad-data.

1.4.2.2 *Il-Kontrolli*

1.4.2.2.1 Is-sensittività għar-radjazzjoni taċ-ċelloli, l-istabbiliment tad-data storika:

Iċ-ċelloli għandhom jiġu ċċekkjati regolarment (madwar kull ħames passaġġ) għal sensittività għall-għajn tad-dawl billi tiġi stmata l-vijabbiltà tagħhom wara espożizzjoni għal doża akbar ta' l-irradjazzjoni. Bosta doża ta' irradjazzjoni, inklużi livelli sostanzjalment ogħla minn dawk użati għat-test tal-Fototossiċità 3T3 NRU għandhom jintużaw f'din l-istima. Dawn id-doża huma kkwantitati bil-mod l-aktar faċli bil-kejl tal-partijiet UV ta' l-għajn tad-dawl. Iċ-ċelloli jiġu miżrugħa bid-densità użata fit-test tal-fototissiċità *in vitro* 3T3 NRU u irradjati l-għada. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli mbagħad tiġi ddeterminata jum wara permezz ta' l-użu ta' l-Aħmar Newtrali. Għandu jintwera li l-ogħla doża riżultanti li mhijiex ċitotossika (eż. fl-istudju tal-validazzjoni: 5 J/cm^2 [UVA]) kienet biżżejjed biex il-materjali ta' riferenza (Tabella 1) jiġu kklassifikati tajjeb.

▼B

1.4.2.2.2 Is-sensittività għar-radjazzjoni, l-iċċekkjar tat-test kurrenti:

It-test jilħaq il-kriterji ta' kwalità jekk il-kontrolli irradjati negattivi/-solventi juru vijabbiltà ta' aktar minn 80 % meta mqabbel ma negattivi/solventi mhux irradjati.

1.4.2.2.3 Il-vijabbiltà tal-kontrolli solventi

Id-densità ottika assoluta ($OD_{540\ NRU}$) ta' l-Aħmar Newtrali estratt mill-kontrolli tas-solventi jindika jekk il-1×10^4 ċelloli miżrugħa f'kull well kibrux b'ħin ta' l-irduppjar normali matul il-jumejn ta' l-analiżi. Test jilħaq il-kriterji ta' l-aċċettazzjoni jekk l-$OD_{540\ NRU}$ medju tal-kontrolli mhux ittrattati huwa $\geq$ 0,4 (jiġifieri madwar għoxrin darba daqs l-assorbenza tas-solvent fl-isfond).

1.4.2.2.4 Il-kontroll pożittiv:

Kimika fototossika magħrufa għandha tiġi ttestjata fl-istess ħin ma' kull test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU. Huwa rakkomandat il-chlorpromazine (CPZ). Għal CPZ ittestjat bil-protokoll standard fit-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU, ġew definiti dawn il-kriterji li ġejjin ta' l-aċċettazzjoni tat-test: CPZ irradjat (+Irr): IC_{50} = 0,1 sa 2,0 µg/ml, CPZ mhux irradjat (-Irr): IC_{50} = 7,0 sa 90,0 µg/mL. l-Fattur tal-Foto Irritazzjoni (PIF), għandu jkun > 6. Il-ħidma storika tal-kontroll pożittiv għandha tiġi mmonitorjata.

Kimiċi oħrajn fototossiċi, xierqa għall-klassi tal-kimika jew il-karatteristiċi tas-solubbiltà tal-kimika li qed tiġi evalwata, jistgħu jintużaw bħala l-kontrolli pożittivi konkurrenti minflok chlorpromazine.

1.4.3 **Il-proċedura tat-test (6)(7)(8)(16)(17):**

1.4.3.1 *L-1 jum:*

Ferra' 100 µL materjal tal-kultura fil-kontenituri periferali fi plattina tal-mikrotitru tal-kultura tat-tessut b'96-well (= vojta). F'dawj li jifdal, ferra' 100 µL sospensjoni ta' ċelloli ta' 1×10^5 ċelloli/mL fil-mezz tal-kultura (= 1×10^4 ċelloli/well). Għandhom jiġu ppreparati żewġ plattini għal kull serje ta' konċentrazzjonijiet individwali tas-sustanza tat-test, u għall-kontrolli tas-solventi u dawk pożittivi.

Inkuba ċ-ċelloli għal 24 siegħa (ara t-taqsima 1.4.1.2) sakemm jiffurmaw nofs monosaff konfluwenti. Dan il-perjodu ta' inkubazzjoni jippermetti l-irkupru taċ-ċelloli, l-aderenza u t-tkabbir esponenzjali.

1.4.3.2 *It-2 jum:*

Wara l-inkubazzjoni, ferra' l-mezz tal-kultura miċ-ċelloli u aħsel bl-attenzjoni b'150 µL tat-taħlita *buffered* użata għall-inkubazzjoni. Żid 100 µL tal-*buffer* li jkun fih il-konċentrazzjoni xierqa tal-kimika jew tas-solvent tat-test (kontroll tas-solvent). Applika 8 konċentrazzjonijiet differenti tal-kimika tat-test. Inkuba ċ-ċelloli bis-sustanza tat-test fid-dlam għal 60 minuta (ara t-taqsima 1.4.1.2 u 1.4.1.4 tieni paragrafu).

Miż-żewġ plattini ppreparati għal kull serje ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u l-kontrolli, tingħażel waħda, ġeneralment bl-addoċċ, għad-determinazzjoni taċ-ċitotossiċità (-Irr) (jiġifieri l-plattina tal-kontroll), u waħda (il-plattina tat-trattament) għad-determinazzjoni tal-fototossiċità (+Irr).

▼B

Biex issir l-espożizzjoni +Irr, irradja ċ-ċelloli f'temperatura ambjentali għal 50 minuta mill-għatu tal-plattina 96-well bl-ogħla doża ta' radjazzjoni li mhijiex ċitotossika (ara wkoll l-Anness 2). Żomm il-plattini mhux irradjati (-Irr) f'temperatura tal-kamra f'kaxxa mudlama 50 min (= ħin ta' l-espożizzjoni għad-dawl).

Ferra' t-taħlita tat-test u aħsel bir-reqqa bl-attenzjoni b'150 µL tat-taħlita *buffered* użata għall-inkubazzjoni, iżda li ma fihiex il-materjal tat-test. Issostitwixxi l-*buffer* bil-mezz tal-kultura u inkuba (ara t-taqsima 1.4.1.2.) għal lejl sħiħ (18-22 h).

1.4.3.3 *It-3 jum:*

1.4.3.3.1 L-evalwazzjoni mikroskopika

Iċ-ċelloli għandhom jiġu eżaminati għat-tkabbir, għall-morfoloġija, u għall-integrità tal-monosaff bl-użu ta' mikroskopu b'faża tal-kuntrast. It-tibdil fil-morfoloġija taċ-ċelloli u l-effetti fuq it-tkabbir taċ-ċelloli għandu jiġi rrekordjat.

1.4.3.3.2 It-test ta' l-użu ta' l-Aħmar Newtrali

Aħsel iċ-ċelloli b'150 µL *buffer* imsaħħan minn qabel. Neħħi t-taħlita tal-ħasil billi ttektek bil-mod. Żid 100 µL ta' 50 µg/mL Aħmar Newtrali (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, numru EINECS 209-035-8; numru CAS 553-24-2; C.I. 50040) f'mezz mingħajr serum (16) u inkuba kif deskritt fil-paragrafu 1.4.1.2., għal 3 h.

Wara l-inkubazzjoni neħħi l-mezz ta' NR, u aħsel iċ-ċelloli b'150 µL mill-*buffer*. Ferra' u neħħi l-żejjed bl-ixxugar jew biċ-ċentrifugazzjoni.

Żid preċiżament 150 µL taħlita NR desorb (ippreparata friska 49 partijiet ilma + 50 partijiet etanol + 1 parti aċidu aċetiku).

Ħawwad il-plattina tal-mikrotitru bil-mnod fuq oġġett li jħawwad il-plattina tal-mikrotitru għal 10 minuti sakemm l-NR ikun ġie estratt miċ-ċelloli u jkun iffurma taħlita omoġena. Kejjel id-densità ottika ta' l-estratt ta' l-NR f'540 nm fi spettrofotometru, bl-użu tal-vojt bħala referenza. Issejvja d-data f'format xieraq ta' fajl elettroniku għall-analiżi wara.

2. **ID-DATA**

IL-KWALITÀ U L-KWANTITÀ TAD-DATA

Id-data tat-test tippermetti analiżi sinjifikanti tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni, u jekk possibbli l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test li biha l-vijabilità hija mnaqqsa għal 50 % (IC_{50}). Jekk tinsab iċ-ċitotossiċità, kemm il-firxa tal-konċentrazzjoni kif ukoll l-interċett tal-konċentrazzjonijiet individwali għandhom jiġu stabbiliti b'tali mod li tkun possibbli li toqgħod kurva għad-data esperimentali.

Għar-riżultati kemm ċarament pożittivi kif ukoll dawk ċarament negattivi (ara t-taqsima 2.3, l-ewwel paragrafu), l-esperiment primarju, sostnut minn esperiment(i) wieħed jew aktar preliminary tas-sejba tad-doża, jista' jkun biżżejjed.

▼B

Ir-riżultati ekwivoċi, li huma fil-limitu, jew mhux ċari għandhom jiġu ċċarati bl-użu ta' aktar ittestjar (ara wkoll it-taqsima 2.4, tieni paragrafu). F'dawn il-każijiet, il-modifika tal-kundizzjonijiet esperimentali għandha tiġi kkunsidrata. Il-kundizzjonijiet esperimentali li jistgħu jiġu mmodifikati jinkludu l-firxa jew l-ispazjar tal-konċentrazzjoni, il-ħin ta' qabel l-inkubazzjoni, u l-ħin ta' l-espożizzjoni għall-irradjazzjoni. Ħin iqsar ta' espożizzjoni jista' jkun xieraq għall-kimiċi li mhumiex stabbli fl-ilma.

L-EVALWAZZJONI TAR-RIZULTATI

Biex tkun possibbli l-evalwazzjoni tad-data, jista' jiġi kkalkolat Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF) jew Foto Effett Medju (MPE – *mean photo effect*).

Għall-kalkolu tal-miżuri tal-fotoċitossiċità (ara taħt), is-sett ta' valuri diskreti tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni għandu jiġi approssimat b'kurva xierqa kontinwa tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni (mudell). It-tqegħid tal-kurva għad-data spiss isir b'metodu ta' regressjoni mhux lineari (18). Biex tiġi stmata l-influwenza tal-varjabbiltà tad-data fuq il-kurva mqiegħda hija rrakkomandata proċedura *bootstrap*.

Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF) jiġi kkalkolat bl-użu ta' din il-formula:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Jekk ma jistax jiġi kkalkolat l-IC_{50} fil-preżenza jew fin-nuqqas tad-dawl, PIF ma jistax jiġi ddeterminat għall-materjal tat-test. Il-foto effett medju (MPE) huwa bbażat fuq it-tqabbil tal-kurvi sħaħ tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni (19). Huwa ddefinit bħala l-medju bil-piż tul sett rappreżentattiv ta' valuri tal-foto effett

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Il-foto-effett PE_c fi kwalunkwe konċentrazzjoni C huwa definit bħala l-prodott ta' l-effett tar-reazzjoni RE_c u l-effett tad-doża DE_c i.e. $PE_c = RE_c \times DE_c$. L-effett tar-reazzjoni RE_c huwa d-differenza bejn ir-reazzjonijiet osservati fin-nuqqas u fil-preżenza tad-dawl, jiġifieri. $RE_c = R_c$ (-Irr) – R_c (+Irr). L-effett tad-doża jingħata b':

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

fejn C* tirrappreżenta l-konċentrazzjoni ta' l-ekwivalenza, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha r-reazzjoni ta' +Irr hija daqs ir-reazzjoni ta' –Irr fil-konċentrazzjoni C. Jekk C* ma tista'x tiġi determinata minħabba li l-valuri tar-reazzjoni tal-kurva +Irr huma sistematikament ogħla jew aktar baxxi minn R_C (-Irr) l-effett tad-doża huwa stabbilit bħala 1. Il-fatturi tal-piżijiet w_i jingħataw bl-ogħla valur ta' reazzjoni, jiġifieri w_i = MAX {R_i (+Irr), R_i (-Irr) }. Ix-xibka tal-kaxxi tal-konċentrazzjoni C_i tingħażel b'tali mod li l-istess għadd ta' punti jaqa' taħt kull wieħed mill-intervalli tal-konċentrazzjoni definiti mill-valuri tal-konċentrazzjoni użati fl-esperiment. Il-kalkolu ta' l-MPE huwa ristrett għall-valur massimu ta' konċentrazzjoni li fiha għall-inqas waħda miż-żewġ kurvi għadha turi valur ta' reazzjoni ta' mhux inqas minn 10 %. Jekk din il-konċentrazzjoni massima hija ogħla mill-ogħla konċentrazzjoni użata fl-esperiment +Irr il-parti residwali tal-kurva +Irr hija stabbilita bħala l-valur ta' reazzjoni "0". Skond jekk il-valur ta' l-MPE huwiex akbar minn valur ta' limitu magħżul tajjeb (MPE_c = 0,15), il-kimika hija kklassifikata bħala fototossika.

▼B

Pakkett ta’ softwer għall-kalkolu tal-PIF u tal-MPE huwa disponibbli minn (20).

L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Fuq bażi ta’ l-istudju tal-validazzjoni (8), sustanza tat-test b’PIF < 2 jew MPE < 0,1 tbassar: “ebda fototossiċità”. PIF > 2 u < 5 jew MPE > 0,1 u < 0,15 tbassar: “fototossiċità probabbli”; u PIF > 5 jew MPE > 0,15 tbassar: “fototossiċità”.

Għal kwalunkwe laboratorju li jista’bbilixxi din l-analiżi għall-ewwel darba, il-materjali ta’ riferenza elenkati fit-Tabella 1 għandhom jiġu ttestjati qabel ma jiġu ttestjati s-sustanzi tat-test għall-istima fototossika. Il-valuri tal-PIF jew ta’ l-MPE għandhom ikunu qrib il-valuri msemmija fit-Tabella 1.

Tabella 1

Isem il-kimika	Nru EINECS	Nru CAS	PIF	MPE	L-ogħla punt ta’ l-assorbiment	Solvent ([1])
Amiodarone HCL	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (fl-ispalla)	ehanol
Choloropromazine HCL	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitrile
Anthracene	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-Histidine		[7006-35-1]	no PIF	0,05-0,10	211 nm	Ilma
Hexacholorophene	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (fl-ispalla)	etanol
Sodium lauryl sulphate	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	l-ebda assorbiment	Ilma

([1]) Solvent użat biex jitkejjel l-assorbiment.

L-INTERPRETAZZJONI TAD-DATA

Jekk l-effetti fototossiċi huma osservati biss fl-ogħla test tal-konċentrazzjoni (speċjalment għall-kimiċi tat-test li jinħallu fl-ilma) jistgħu jkunu meħtieġa kunsiderazzjonijiet addizzjonali għall-istima ta’ l-azzard. Dawn jistgħu jinkludu d-data dwar l-assorbiment mill-ġilda, u l-akkumulazzjoni tal-kimika fil-ġilda u/jew data minn testijiet oħrajn, eż. l-ittestjar tal-kimika fil-ġilda ta’ l-annimali jew umana *in vitro*, jew mudelli tal-ġilda.

▼B

Jekk ma tintwera ebda tossiċità (+Irr u -Irr), u jekk is-solubilità llimitat il-konċentrazzjonijiet li setgħu jiġu ttestjati, il-kompatibilità tas-sustanza tat-test ma' l-analiżi tista' tiġi fid-dubju u t-testjar konfermatorju għandu jiġi kkonsidrat bl-użu, eż. ta' mudell ieħor.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi għall-inqas din l-informazzjoni li ġejja:

Is-Sustanza tat-Test:

— id-data ta' l-identifikazzjoni, ismijiet ġeneriċi komuni u n-numri IUPAC u CAS, jekk magħrufin;

— in-natura fiżika u safa;

— il-karatteristiċi fiżikokimiċi jekk inhuma rilevanti għat-twettiq ta' l-istudju;

— l-ispettru ta' l-assorbiment UV/vis;

— l-istabilità, u l-fotostabilità jekk magħrufin.

Solvent:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;

— solubilita tal-kimika tat-test fis-solvent;

— persentaġġ tas-solvent preżenti fil-mezz tat-trattament.

Iċ-ċelloli

— tip u għajn taċ-ċelloli;

— nuqqas ta' mycoplasma;

— l-għadd tal-mogħdija taċ-ċelloli, jekk magħruf;

— Is-sensittività taċ-ċelloli għar-radjazzjoni, ddeterminata bit-tagħmir ta' l-irradjazzjoni użat fit-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU;

Il-kundizzjonijiet tat-test (1); *inkubazzjoni qabel u wara t-trattament:*

— tip u kompożizzjoni tal-mezz tal-kultura;

— kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni (konċentrazzjoni ta' CO_2; temperatura; umdità);

— kemm iddum l-inkubazzjoni (qabel it-trattament; wara t-trattament).

Il-kundizzjonijiet tat-test (2); *trattament bil-kimika:*

— ir-raġuni għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test użati fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni;

— fil-każ ta' solubilità limitata tal-kimika tat-test u ta' nuqqas ta' ċitotossiċità: ir-raġuni għall-ogħla konċentrazzjoni ttestjata;

— tip u kompożizzjoni tal-mezz tat-trattament (taħlita ta' melħ buffered);

— kemm idum it-trattament kimiku.

Il-kundizzjonijiet tat-test (3); *l-irradjazzjoni:*

— ir-raġuni għall-għażla ta' l-għajn tad-dawl użat;

▼B

— manifattur u tip ta’ għajn tad-dawl u radjometru;

— karatteristiċi ta’ l-irradjanza spettrali ta’ l-għajn tad-dawl;

— karatteristiċi ta’ trażmissjoni u assorbiment tal-fitru/i użat(i);

— karatteristiċi tar-radjometru u d-dettalji dwar il-kalibrazzjoni tiegħu;

— distanza ta’ l-għajn tad-dawl mis-sistema tat-test;

— l-irradjanza tal-UVA f’din id-distanza, espresso f’mW/cm^2;

— kemm iddum l-espożizzjoni tad-dawl UV/vis;

— doża ta’ l-UVA (irradjanza x ħin), espressa f’J/cm^2;

— temperatura tal-kulturi taċ-ċelloli matul l-irradjazzjoni u l-kulturi taċ-ċelloli li jinżammu fid-dlam konkorrentement.

Il-kundizzjonijiet tat-test (4); *test tal-vijabilità ta’ l-Aħmar Newtrali:*

— kompożizzjoni tal-mezz tat-trattament ta’ l-Aħmar Newtrali;

— kemm iddum l-inkubazzjoni ta’ l-Aħmar Newtrali;

— kundizzjonijiet ta’ l-inkubazzjoni (konċentrazzjoni ta’ CO_2; temperatura; umdità);

— kundizzjonijiet ta’ l-estrazzjoni ta’ l-Aħmar Newtrali (estrattant; kemm idum);

— *wavelength* użata għall-qari spettrofotometriku tad-densità ottika ta’ l-Aħmar Newtrali;

— tieni *wavelength* (referenza), jekk tintuża;

— kontenut ta’ vojt ta’ l-ispettrofotometru, jekk użat.

Riżultati:

— il-vijabilità taċ-ċelloli miksuba f’kull konċentrazzjoni tal-kimika tat-test, espressa f’persentaġġ ta’ vijabilità ta’ kontrolli solventi medji u konkorrenti;

— kurvi tar-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni (konċentrazzjoni tal-kimika tat-test vs. vijabilità relattiva taċ-ċelloli) miksuba f’esperimenti konkorrenti +Irr u -Irr;

— analiżi tal-kurvi tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni: jekk possibbli, il-komputazzjoni/kalkolu ta’ l-IC_{50} (+Irr) u IC_{50} (-Irr);

— tqabbil ta’ żewġ kurvi tar-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza u fin-nuqqas ta’ l-irradjazzjoni, bil-kalkolu tal-Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF), jew bil-kalkolu tal-Foto Effett Medju (MPE);

— il-kriterji ta’ l-aċċettazzjoni tat-test; il-kontroll konkurrenti tas-solvent:

— il-vijabilità assoluta (densità ottika ta’ l-estratt ta’ l-Aħmar Newtrali) ta’ ċelloli irradjati u mhux irradjati;

— id-data storika tal-kontrolli negattivi u dawk solventi; devjazzjonijiet medji u dawk standard;

— kriterji ta’ l-aċċettazzjoni tat-test; kontroll pożittiv konkurrenti;

▼B

— IC_{50} (+Irr) u IC_{50} (-Irr) u PIF/MPE tal-kimika tal-kontroll pożittiv;

— id-data storika tal-kontrolli pożittivi kimiċi: IC_{50} (+Irr) u IC_{50} (-Irr) u PIF/MPE; devjazzjonijiet medji u dawk standard.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. *In vitro* 7: 95-102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-V.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. Tieni edizzjoni, p 79-110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Pariġi.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. *In vitro* 8, 793-796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 ta' Novembru 1997, ATLA, 26, 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. *In vitro* 12, 305-327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30^{th}-31^{th} October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15 ta' Marzu 2002, OECD ENV/EHS, disponibbli fuq talba mis-Segretarjat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119-124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. Ħames edizzjoni, p 515-530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 ta' Settembru, 1998. 18 paġni.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

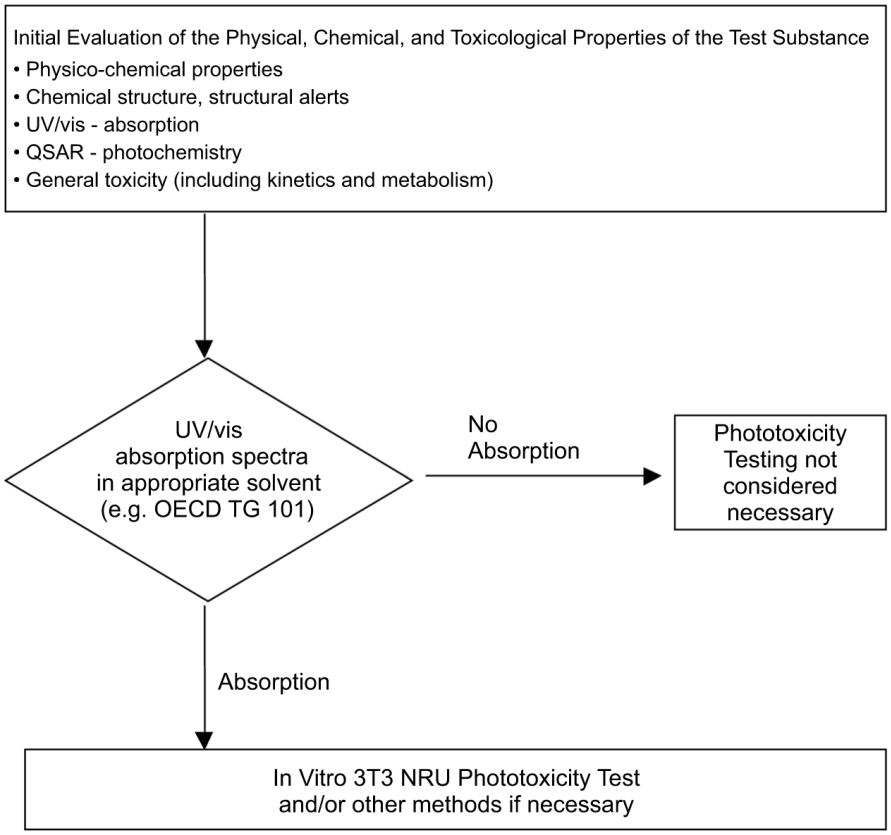
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

L-ANNESS 1

Ir-rwol tat-3T3 NRU PT fi strateġija sekwenzjali għall-ittestjar tal-fototossiċità tal-kimiċi

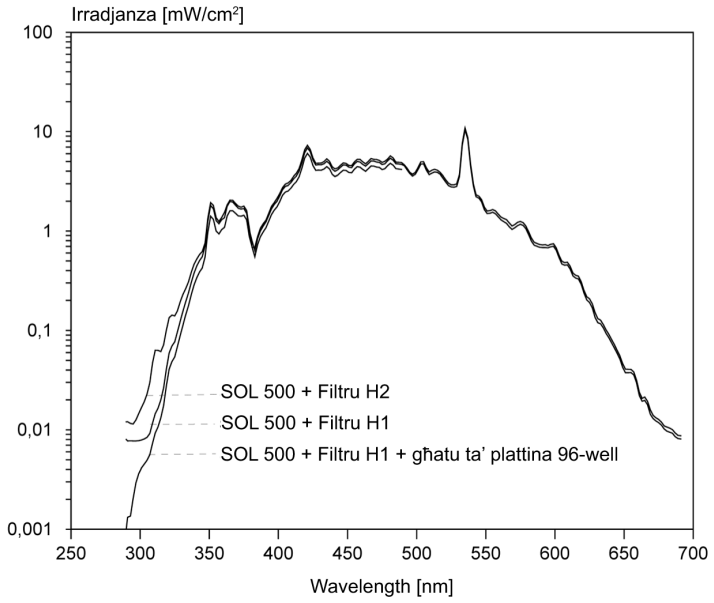


▼B

L-ANNESS 2

Figura 1

Distribuzzjoni ta' poter spettrali tas-simulatur tax-xemx iffiltrat



(ara t-taqsima 1.4.1.5, tieni paragrafu)

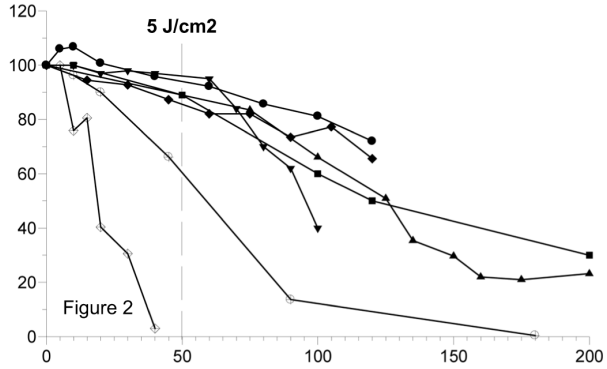
Il-Figura 1 tagħti eżempju ta' distribuzzjoni ta' irradjanza spettrali aċċettabbli ta' simulatur tax-xemx iffiltrat. Huwa mill-għajn ta' alid tal-metall *doped* fil-prova tal-validazzjoni tat-3T3 NRU PT (6)(8)(17). L-effett ta' żewġ filtri differenti użati u l-effett addizzjoni ta' filtri ta' l-għatu ta' plattina 96-well tal-kultura huma murija. Il-filtru H2 intuża biss ma' sistemi tat-test li jistgħu jittolleraw ammont ogħla ta' UVB (test tal-mudell tal-ġilda u ttest tal-fotoħemoliżi taċ-ċelloli ħomor tad-demm). Fit-3T3 NRU-PT intuża l-filtru H1. Il-figura turi li l-effett addizzjonali ta' filtru ta' l-għatu tal-plattina huwa l-aktar osservat fil-firxa ta' l-UVB, u xorta jħallu biżżejjed UVB fl-ispettru ta' l-irradjazzjoni biex jiġu eċċitati l-kimiċi li tipikament jassorbu l-firxa ta' l-UVB, bħall-Amiodarone (ara t-Tabella 1).

▼B

Figura 2

Is-sensittività ta' l-irradjazzjoni taċ-ċelloli Balb/c 3T3 (kif imkejla fil-firxa UVA)

Il-vijabilità taċ-ċelloli (% użu ta' l-Aħmar Newtrali tal-kontrolli skuri)



Hin ta' l-irradjazzjoni (minuti)

(10 min = 1 joule UVA/cm^2)

(ara t-taqsimiet 1.4.1.5.2 tieni paragrafu; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Is-sensittività taċ-ċelloli Balb/c 3T3 għall-irradjazzjoni mas-simulatur tax-xemx użat fil-prova tal-validazzjoni tat-Test tal-Fototossiċità 3T3NRU, kif imkejla fil-firxa ta' l-UVA. Il-figura turi r-riżultati miksuba f'7 laboratorji differenti fl-istudju tal-pre-validazzjoni (1). Filwaqt li ż-żewġ kurvi b'simboli miftuħa nkisbu b'ċelloli li saru anzjani (numru għoli ta' passaġġi), li kellhom jiġu sostitwiti b'ħażniet ta' ċelloli ġodda il-kurvi bis-simboli li jispikkaw juru ċ-ċelloli b'tolleranza ta' irradjazzjoni aċċettabbli.

Minn din id-data ġiet derivata l-ogħla irradjazzjoni mhux ċitotossika ta' 5 J/cm^2 (linja ttikkjata vertikali). Il-linja ttikkjata orizzontali turi barra minn dan l-effett massimu aċċettabli ta' l-irradjazzjoni mogħti fil-paragrafu 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULA TAL-LIMFA LOKALI**

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. Il-Metodu ta' Ttestjar oriġinali (TM) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali (LLNA; Linja Gwida ta' Ttestjar 429 tal-OECD; il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness) ġie adottat qabel (1) Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u analiżi tax-xogħol assoċjat ġew ippubblikati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). L-LLNA aġġornata hija bbażata fuq l-evalwazzjoni tal-esperjenza u tad-dejta xjentifika (12). Dan huwa t-tieni TM imfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. It-TM l-ieħor (jiġifieri l-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar; il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness) juża testijiet fuq il-fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni fuq il-fenek tal-Indi u t-test Buehler (13). L-LLNA tipprovdi vantaġġi fuq il-B.6 u fuq il-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13) fir-rigward tal-benessri tal-annimali. Dan it-TM aġġornat tal-LLNA jinkludi sett ta' Standards ta' Prestazzjoni (PS) (Appendiċi 1) li jistgħu jintużaw fl-evalwazzjoni tal-istatus ta' validazzjoni ta' metodi ġodda u/jew mibdula ta' ttestjar li huma mekkanikament u funzjonalment simili għal-LLNA, f'konformità mal-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida Nru 34 tal-OECD (14).

2. L-LLNA tistudja l-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva adattata għall-valutazzjoni tad-doża u r-reazzjoni. Għandu jiġi nnotat li s-sensitizzaturi ħfief/moderati li huma rrakkomandati bħala sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv adattati (PC) għall-metodi ta' ttestjar fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B. 6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13) huma adattati wkoll għall-użu mal-LLNA (6) (8) (15). L-approċċ ta' LLNA mnaqqsa (rLLNA), li tista' tuża sa 40 % inqas annimali huwa deskritt ukoll bħala għażla f'dan it-TM (16) (17) (18). L-rLLNA tista' tintuża meta jkun hemm ħtieġa regolatorja li tiġi kkonfermata previżjoni negattiva tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, sakemm ikun hemm konformità mal-ispeċifikazzjonijiet l-oħrajn kollha ta' protokoll tal-LLNA, kif deskritt f'dan it-TM. Il-previżjoni ta' eżitu negattiv għandha ssir fuq il-bażi tal-informazzjoni kollha disponibbli kif deskritt fil-paragrafu 4. Qabel ma jiġi applikat l-approċċ rLLNA, għandhom jiġu pprovduti ġustifikazzjonijiet ċari u loġika xjentifika għall-użu tiegħu. Jekk, kontra dak mistenni, jinkiseb riżultat pożittiv jew ekwivoku fl-rLLNA, jista' jkun meħtieġ aktar ittestjar sabiex tiġi interpretata jew iċċarata s-sejba. L-rLLNA ma għandhiex tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi ta' testijiet li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni bħas-subkategorizzazzjoni għar-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet u s-Sistema Globalment Armonizzata tan-NU tal-Klassifikazzjoni u t-Tikkettar tas-Sustanzi Kimiċi.

DEFINIZZJONIJIET

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA tipprovdi metodu alternattiv għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda. Dan mhux neċessarjament jimplika li l-LLNA għandha tintuża minflok it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi fil-każijiet kollha (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma. Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq

▼M3

l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA hijiex adattata għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA-ara l-paragrafu 5) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Għandu, madankollu, il-potenzjal li jnaqqas l-għadd ta' annimali meħtieġa għal dan il-għan. Barra minn hekk, l-LLNA toffri rfinar sostanzjali (inqas uġigħ u tbatija) fil-mod kif jintużaw l-annimali għall-ittestjar tas-sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. L-LLNA hija bbażata fuq il-konsiderazzjoni ta' avvenimenti immunoloġiċi stimulati b'sustanzi kimiċi matul il-fażi induttiva tas-sensitizzazzjoni. Għall-kuntrarju tat-testijiet fuq il-fenek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13) l-LLNA ma teħtieġx li r-reazzjonijiet tal-ipersensittività tal-ġilda indotti bi sfida jkunu elucidati. Barra minn hekk, l-LLNA ma teħtieġx l-użu ta' aġġuvant, bħal fil-każ tat-test tal-massimizzazzjoni fuq il-fenek tal-Indi (13). Għalhekk, l-LLNA tnaqqas l-uġigħ u t-tbatija tal-annimali. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar, għandu jkun rikonoxxut li hemm ċerti limitazzjonijiet li jistgħu jkunu jeħtieġu l-użu ta' B.6 jew tal-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13) (eż. sejbiet negattivi foloz fl-LLNA b'ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal ċerti sustanzi kimiċi tat-tip tensjoattivi] (19) (20), jew solubbiltà tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (21) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13). Barra minn hekk, skont il-bażi tad-dejta ta' validazzjoni limitata, li kienet tikkonsisti prinċipalment minn formulazzjonijiet ta' pestiċidi, l-LLNA aktarx li tagħti aktar riżultat pożittiv mit-test fuq il-fniek tal-Indi għal dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test (22). Madankollu, meta wieħed jeżamina l-formulazzjonijiet, jista' jikkunsidra li jinkludi sustanzi simili b'riżultati magħrufa bħala sustanzi ta' referenza sabiex juri li l-LLNA qiegħda taħdem kif suppost (ara l-paragrafu 16). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA għandha tkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi li jistgħu jinterferixxu mal-eżattezza tal-LLNA.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (vehicle treated control, VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjaħ l-Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI), jiġi stabbilit, u għandu jkun ≥ 3 qabel ma tkun meħtieġa l-klassifikazzjoni tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu ta' tikkettar radjoattiv *in vivo* għall-kejl ta' żieda fl-għadd ta' ċelloli proliferanti fin-noduli tal-limfa awrikolari li jsaffu. Madankollu, jistgħu jintużaw għanijiet finali oħrajn għall-valutazzjoni tal-għadd ta' ċelloli proliferanti sakemm ir-rekwiżiti tal-PS ikunu għalkollox issodisfati (Appendiċi 1).

▼M3

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

L-għażla tal-ispeċijiet tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi magħżula għal dan it-test. Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħażagħ tar-razza CBA/Ca jew CBA/J, li jkunu għadhom mhux mgħammra u mhux tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA.

Il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ u l-għalf

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (23), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 % ħlief waqt it-tindif tal-kamra, l-għan għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, u 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel ma jibda t-trattament, l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati sabiex jiġi żgurat li ma jkollhom l-ebda ferita osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Is-sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli bħala sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex din turi l-kompetenza tal-laboratorju li jwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Huwa meħtieġ ukoll PC għal kull studju wkoll minn ċerti awtoritajiet regolatorji u għaldaqstant l-utenti huma mħeġġa sabiex jikkonsultaw lill-awtoritajiet rilevanti qabel ma jwettqu l-LLNA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu r-rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandu jipproduċi reazzjoni tal-LLNA pożittiva f'livell ta' esponiment li mistenni

▼M3

jagħti żieda fl-SI > 3 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni tkun riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 20 ikun eċċessiv). Il-PC preferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Chemical Abstracts Service [CAS] Nru tal-CAS 101-86-0) fl-aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v) u 5 % merkaptobenżotijażol (Nru tal-CAS 149-30-4) f'*N,N*-dimetilformammid (ara l-Appendiċi 1, it-Tabella 1). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Għalkemm l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storiku stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC f'mill-inqas 10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom ikunu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati ta' studju negattivi ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodiku aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodiku mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubjuż. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom jiġu kkunsidrati b'attenzjoni meta jiġi deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (12).

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat fil-mezz li huwa magħruf li jqanqal reazzjoni konsistenti (eż. aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom l-ittestjar f'mezz mhux standard (formulazzjoni rilevanti klinikament/kimikament) ikun meħtieġ ukoll (24). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanju.

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex isib il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

— xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,

— karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,

— dejta ta' appoġġ mil-LLNA,

— dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

▼M3

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli ta' doża

17. Minimu ta' erba' annimali għandhom jintużaw għal kull grupp ta' doża, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u PC (simultanju jew reċenti, ibbażat fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' doži multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Ħlief għan-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom ikunu mmaniġġjati u ttrattati bl-istess mod bħall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi (3) u (5). Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (3) (25). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (19) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet jista' jkun meħtieġ li jintuża solvent klinikament rilevanti jew il-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test tkun ikkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi tat-test idrofiliċi jkunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi għalkollox likwidi għandhom jiġu evitati.

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara l-paragrafu 35). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tinġabar dejta dwar annimali individwali (12). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Madankollu, id-dejta dwar gruppi ta' annimali tista' titqies aċċettabbli minn ċerti awtoritajiet regolatorji u f'dawn is-sitwazzjonijiet, l-utenti jista' jkollhom l-għażla li jiġbru kemm dejta dwar annimali individwali kif ukoll dejta dwar gruppi ta' annimali.

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun iddeterminata l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara l-paragrafu (18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi ddefinit il-livell ta' doża xierqa li għandha tkun ittestjata fl-LLNA. L-iskop tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell massimu ta' doża li għandu jintuża fl-istudju ewlieni tal-LLNA, meta l-informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li tikkawża tossiċità sistemika (ara l-paragrafu 24) u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda (ara l-paragrafu 23) ma tkunx disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

▼M3

22. It-test ta’ qabel l-iskrinjar isir skont l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA, ħlief għall-fatt li ma jkunx ħemm valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta’ doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta’ doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta’ tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 6). Il-widnejn ta’ kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema (ħmura) u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (25). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta’ gejġ ta’ ħxuna (*eż.* mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) f'Jum 1 (qabel id-doża), f'Jum 3 (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), u f'Jum 6. Barra minn hekk, fis-sitt Jum, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta’ determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta’ eritema ≥ 3 u/jew żieda fil-ħxuna tal-widna ta’ ≥ 25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (26) (27). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta’ konċentrazzjonijiet ta’ qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta’ tessut oħxon u danneġġat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta’ 25 % fil-ħxuna tal-widna (26) (27), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma’ irritazzjoni eċċessiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (35) (36) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (*eż.* pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta’ attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispnea, nifs maqtugħ, u ħsejjes fil-pulmun (rales)), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta’ letarġija u/jew nuqqas ta’ reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta’ aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta’ > 5 % fil-piż tal-ġisem mill-ewwel Jum sas-sitt Jum, u l-imwiet għandhom jiġu kkunsidrati fil-valutazzjoni. Annimali li waslu biex imutu jew annimali li jkunu viżibilment muġugħa jew li juru sinjali ta’ tbatija kbira u persistenti għandhom jinqatlu b'mod uman (37).

▼M3

Skeda ta' sperimentazzjoni tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda ta' sperimentazzjoni tal-analiżi hija kif ġej:

— *L-ewwel Jum:* Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15), fuq il-wara ta' kull widna.

— *It-tieni u t-tielet Jum:* Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni li għamilt fl-ewwel Jum.

— *Ir-raba' u l-ħames Jum:* L-ebda trattament.

— *Is-sitt jum:* Ħu nota tal-piż ta' kull annimal. Injetta 250 µL ta' soluzzjoni ta' ilma bil-melħ ibbaferjata bil-fosfat (phosphate-buffered saline, PBS) sterili li fih 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) ta' (^{3}H)-metiltimidin ittritjat fil-ġrieden kollha tat-test u tal-kontroll permezz tal-vina fid-denb. Inkella, injetta 250 µL PBS sterili li fih 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ta' ^{125}I-jododeossiuridin u 10^{-5}M fluworodeossiuridin fil-ġrieden kollha permezz tal-vina fid-denb. Ħames (5) sigħat wara, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' n-noduli limfatiċi awrikolari li jnixxu minn kull widna tal-ġrieden u pproċessa flimkien f'PBS għal kull annimal (metodu b'annimali individwali); inkella aqta' u iġbor in-noduli limfatiċi minn kull widna f'PBS għal kull grupp ta' trattament (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura). Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (12). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta' gejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Sospensjoni ta' ċellola waħda ta' ċelloli tan-noduli limfatiċi (LNC) maqtugħa minn żewġ naħat permezz tal-metodu b'annimali individwali jew inkella, il-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura titħejja permezz ta' diżaggregazzjoni mekkanika ħafifa minn ġo garża ta' 200 micron-tal-azzar inossidabbli jew teknika aċċettabbli oħra għall-ġenerazzjoni ta' sospensjoni ta' ċellola waħda. L-LNC jinħaslu darbtejn b'eċċess ta' PBS u d-DNA jiġi sseparat b'5 % aċidu trikloroaċetiku (TCA) f'4 °C għal 18-il siegħa (3). Il-pelits jew jiġu sospiżi mill-ġdid f'1mL TCA u trasferiti f'kunjetti ta' xintillazzjoni li jkun fihom 10mL ta' likwidu ta' xintillazzjoni għall-għadd ta' ^{3}H, jew trasferiti direttament f'tubi għall-għadd tal-gamma għall-għadd ta' ^{125}I.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli (radjuattività inkorporata)

27. L-inkorporazzjoni ta' ^{3}H-metiltimidin titkejjel bl-għadd ta' xintillazzjoni β bħala diżintegrazzjonijiet kull minuta (DPM). L-inkorporazzjoni ta' ^{125}I-jododeossiuridin titkejjel bl-għadd ta' ^{125}I u hija espressa wkoll bħala DPM. Skont il-metodu użat, l-inkorporazzjoni hija espressa bħala DPM/ġurdien (metodu b'annimali individwali) jew DPM/grupp ta' trattament (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura).

LLNA mnaqqas

28. F'ċerti sitwazzjonijiet, meta jkun hemm ħtieġa regolatorja li tkun ikkonfermata l-previżjoni negattiva tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, jista' jintuża protokoll fakultattiv ta' rLLNA (16) (17) (18) b'inqas annimali, sakemm ikun hemm konformità mal-ispeċifikazzjonijiet l-oħrajn kollha tal-protokoll tal-LLNA f'dan it-TM. Qabel ma jiġi applikat l-approċċ ta' rLLNA, għandhom jiġu pprovduti ġustifikazzjonijiet ċari u loġika xjentifika għall-użu tiegħu. Jekk jinkiseb riżultat pożittiv jew ekwivoku, jista' jkun meħtieġ aktar ittestjar sabiex is-sejba tiġi interpretata jew iċċarata.

▼M3

29. It-tnaqqis fl-għadd ta' gruppi ta' doża huwa l-unika differenza bejn il-protokolli tal-metodi tat-testijiet LLNA u rLLNA u għal din ir-raġuni l-rLLNA ma tipprovdix informazzjoni dwar id-doża u r-reazzjoni. Għal-hekk, l-rLLNA ma għandhiex tintuża meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar id-doża u r-reazzjoni. Bħal-LLNA b'diversi dożi, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ivvalutata fl-rLLNA għandha tkun il-konċentrazzjoni massima li ma tikkawżax tossiċità sistemika evidenti u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda fil-ġurdien (ara l-paragrafu 18).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

30. Kull ġurdien għandu jkun osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjanijiet ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (37).

Piżijiet tal-ġisem

31. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman li tkun skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

32. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI. Meta jintuża l-metodu b'annimali individwali, l-SI jinstab billi wieħed jiddividi d-DPM/ġurdien medju f'kull grupp tas-sustanza tat-test, u l-grupp PC, bid-DPM/ġurdien medju għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed. Meta jintuża l-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura, l-SI jinstab billi wieħed jiddividi l-inkorporazzjoni radjuattiva miġbura għal kull grupp ta' trattament bl-inkorporazzjoni tal-grupp VC miġbur; dan jagħti SI medju.

33. Il-proċess ta' deċiżjoni jqis riżultat pożittiv meta l-SI ≥ 3. Madankollu, il-qawwa tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali jiġix iddikjarat pożittiv (4)(5)(6).

34. Jekk ikun jeħtieġ li jiġu ċċarati r-riżultati miksuba, għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensitizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall f'parti oħra (7).

35. Il-ġbir ta' dejta dwar ir-radjuattività fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull evalwazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari ma' tqabbil ta' VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-evalwazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi bi jew mingħajr ċerti punti ta' dejta (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

▼M3

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

36. Id-dejta għandha titqassar f'tabelli. Meta wieħed juża l-metodu b'annimali individwali, għandu juri l-valuri DPM tal-annimal individwali, il-medja DPM/annimal tal-grupp, it-terminu tal-iżball assoċjat tagħha (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mal-grupp VC simultanju. Meta jintuża l-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura, wieħed għandu juri l-medja tad-DPM u l-SI medju għal kull grupp ta' doża mqabbel mal-grupp VC simultanju.

Rapport tat-test

37. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi tat-test u ta' kontroll:

— dejta dwar l-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott),

— in-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi (eż. volatilità, stabbiltà, solubbiltà),

— f'każ ta' taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti.

Solvent/mezz:

— dejta dwar l-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat),

— raġuni għall-għażla tal-mezz.

Annimali tat-test:

— is-sors tal-ġrieden CBA,

— stat mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf,

— l-għadd u l-età tal-annimali,

— is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,

— raġuni għall-għażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),

— il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikata,

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),

— dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni,

— metodi ta' kejl tat-tossiċità,

— kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi,

— dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju.

Kontroll tal-affidabbiltà:

— sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użat,

— dejta dwar PC simultanju u/jew storiku u dwar NC simultanju għal-laboratorju li qed jagħmel it-test,

▼M3

— jekk ma kienx inkluż PC simultanju, id-dejta u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodiku reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta tal-PC storiku għal-laboratorju li jiġġustifika l-bażi għaliex ma sarx PC simultanju.

Riżultati:

— piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla skedata; kif ukoll il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,

— il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal,

— tabella tal-valuri DPM u tal-valuri SI għal kull ġurdien (metodu b'annimali individwali) jew medji (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura) għal kull grupp ta' trattament,

— il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għad-DPM/ġurdien għal kull grupp ta' trattament u r-riżultati tal-analiżi tal-anomaliji għal kull grupp ta' trattament meta jintuża l-metodu b'annimali individwali,

— l-SI kkalkulat u kejl xieraq ta' varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll meta jintuża l-metodu b'annimali individwali,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,

— analiżijiet statistiċi, fejn xieraq.

Diskussjoni tar-riżultati:

— kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13–31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999–1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985–997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49–59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258–273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274–286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249–257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Appendiċi 1

Standards tal-prestazzjoni għall-valutazzjoni ta' metodi ta' ttestjar LLNA (Local Lymph Node Assay) simili jew modifikati għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda

INTRODUZZJONI

1. L-għan tal-Istandards tal-Prestazzjoni (Performance Standards, PS) huwa li jikkomunikaw il-bażi li fuqha l-metodi ta' ttestjar, kemm ta' speċjalità (jiġifieri bid-dritt tal-awtur, bil-marka kummerċjali, irreġistrati) kif ukoll ġeneriċi jistgħu jiġu ddeterminati li għandhom biżżejjed preċiżjoni u affidabbiltà għal raġunijiet speċifiċi ta' ttestjar. Dawn il-PS, ibbażati fuq metodi ta' ttestjar validati u aċċettati, jistgħu jintużaw sabiex jevalwaw l-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodi simili oħra (li fil-lingwaġġ tat-taħdit komuni jissejħu testijiet "me-too") li huma bbażati fuq prinċipji xjentifiċi simili u sabiex ikejlu jew ibassru l-istess effett bijoloġiku jew tossiku (14).

2. Qabel l-adozzjoni tal-metodi modifikati (jiġifieri, titjib potenzjali propost għal metodu ta' ttestjar approvat), għandu jkun hemm evalwazzjoni sabiex jiġi ddeterminat l-effett tal-bidliet proposti fuq il-prestazzjoni tat-test u sa fejn dawn il-bidliet jaffettwaw l-informazzjoni disponibbli għall-komponenti l-oħra tal-proċess ta' validazzjoni. Skont l-għadd u t-tip ta' bidliet proposti, id-dejta u d-dokumentazzjoni ta' prova ġġenerati għal dawk il-bidliet, dawn għandhom ikunu jew soġġetti għall-istess proċess ta' validazzjoni kif spjegat għal test ġdid, jew, jekk dan ikun xieraq, għal valutazzjoni limitata ta' affidabbiltà u rilevanza billi jintużaw il-PS stabbiliti (14).

3. Metodi simili jew modifikati proposti għall-użu f'dan it-TM (Test Method) għandhom jiġu evalwati sabiex jiġu ddeterminati l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tagħhom billi jintużaw sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw il-firxa sħiħa tar-riżultati tal-LLNA. Sabiex jiġi evitat l-użu mhux neċessarju ta' annimali, huwa ferm rakkomandat li l-iżviluppaturi tal-mudell jikkonsultaw lill-awtoritajiet xierqa qabel ma jibdew l-istudji ta' validazzjoni, f'konformità mal-PS u l-gwida pprovduti f'dan it-TM.

4. Dawn il-PS huma bbażati fuq il-PS (12) armonizzati tal-US-ICCVAM, l-EC-ECVAM u l-JaCVAM-Ġappuniż, sabiex jiġu vvalidati verżjonijiet simili jew modifikati tal-LLNA. Il-PS jikkonsistu fil-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar, is-sustanzi ta' referenza rakkomandati u l-istandards għall-preċiżjoni u l-affidabbiltà li l-metodu propost għandu jilħaq jew jaqbeż.

I. **Komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar**

5. Sabiex jiġi żgurat li metodu tal-LLNA simili jew modifikat huwa analogu b'mod funzjonali u mekkanistiku għal-LLNA u jkejjel l-istess effett bijoloġiku, il-komponenti li ġejjin għandhom jiġu inklużi fil-protokoll tal-metodu ta' ttestjar:

— Is-sustanza tat-test għandha tiġi applikata b'mod topiku fuq iż-żewġ widnejn tal-ġurdien,

— Il-proliferazzjoni tal-limfoċiti għandha titkejjel fin-nodi limfatiċi li jkunu qed inixxu mill-post tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,

— Il-proliferazzjoni tal-limfoċiti għandha titkejjel waqt il-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda,

▼M3

— Għas-sustanzi tat-test, l-ogħla doża magħżula għandha tkun il-konċentrazzjoni massima li ma tipprovokax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni eċċessiva tal-ġilda lokali fil-ġurdien. Għal sustanzi kimiċi ta' referenza pożittivi, bħala minimu, l-ogħla doża għandha tkun għolja daqs il-valuri tal-EC3 (Konċentrazzjoni Stmata 3) tal-LLNA tas-sustanzi kimiċi ta' referenza korrispondenti (ara t-Tabella 1) mingħajr ma tiġi prodotta tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni eċċessiva tal-ġilda lokali tal-ġurdien,

— VC simultanju għandu jiġu inkluż f'kull studju u, fejn xieraq, għandu jintuża PC simultanju wkoll,

— Għandu jintuża minimu ta' erba' annimali għal kull grupp ta' doża,

— Tista' tingħabar dejta individwali jew inkella fi grupp dwar l-annimali.

F'każ li ma jintlaħaqx xi wieħed minn dawn il-kriterji, dawn il-PS ma jistgħux jintużaw għall-validazzjoni ta' metodu simili jew modifikat.

II. **Lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' referenza**

6. Il-PS (12) armonizzati tal-US-ICCVAM, l-EC-ECVAM u l-JaCVAM-Ġappuniż identifikaw 18-il sustanza kimika ta' referenza minimi li għandhom jintużaw u erba' sustanzi kimiċi ta' referenza fakultattivi (jiġifieri sustanzi li jew ipproduċew riżultati pożittivi foloz jew inkella negattivi foloz fl-LLNA, meta mqabbla ma' riżultati fuq il-bnedim u fuq fniek tal-Indi (B.6, jew il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13), u għaldaqstant, jipprovdu l-opportunità li tintwera prestazzjoni tajba daqs l-LLNA jew aħjar) li huma inklużi fil-PS tal-LLNA. Il-kriterji tal-għażla għall-identifikazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienu:

— Il-lista ta' referenza tas-sustanzi kimiċi rrappreżentat it-tipi ta' sustanzi tipikament ittestjati għall-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u għall-firxa ta' reazzjonijiet li l-LLNA kapaċi jkejjel jew ibassar,

— Is-sustanzi kellhom strutturi kimiċi definiti sew,

— Id-dejta tal-LLNA minn testijiet fuq ħnieżer tal-Indi (jiġifieri B.6; il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13) u (fejn possibbli) id-dejta mill-bnedmin kienet disponibbli għal kull sustanza, u

— Is-sustanzi kienu disponibbli minn sors kummerċjali.

Is-sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati huma elenkati fit-Tabella 1. L-istudji li jużaw is-sustanzi kimiċi ta' referenza proposti għandhom jiġu evalwati fil-mezz li huma elenkati miegħu fit-Tabella 1. Fis-sitwazzjonijiet fejn sustanza elenkata ma tistax tkun disponibbli, jistgħu jintużaw sustanzi oħra li jissodisfaw il-kriterji tal-għażla msemmija, b'ġustifikazzjoni adegwata.

▼M3

Tabella 1

Sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati għall-ps tal-LLNA

Numru	Sustanzi kimiċi ([1])	Nru tal-CAS	Forma	Mezz ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Firxa attwali tal-EC3	LLNA vs. Fenek tal-Indi	LLNA vs. Bniedem
1	5-Kloro-2-metil-4-isotijażolin-3-on (CMI)/2-metil-4-isotijażolin-3-on (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Lik	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilendiammina	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Klorur tal-kobalt	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoewġenol	97-54-1	Lik	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Merkaptobenżotijażol	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Ċitral	5392-40-5	Lik	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Lik	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Ewġenol	97-53-0	Lik	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenilbenżoat	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alkoħol ċinnamiku	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Urea tal-imidażolidinil	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metakrilat tal-metil	80-62-6	Lik	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Klorobenżen	108-90-7	Lik	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Lik	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Numru	Sustanzi kimiċi (1)	Nru tal-CAS	Forma	Mezz (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Firxa attwali tal-EC3	LLNA vs. Fenek tal-Indi	LLNA vs. Bniedem
16	Aċidu lattiku	50-21-5	Lik	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Saliċilat tal-metil	119-36-8	Lik	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Aċidu saliċiliku	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Sustanzi fakultattivi sabiex Tintwera Prestazzjoni Mtejba Relatata mal-LLNA										
19	Sodju lauril sulfat	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Dimetakrilat tal-etilen glikol	97-90-5	Lik	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Ksilen	1330-20-7	Lik	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Klorur tan-nikil	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Taqsiriet: AOO = aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v); Nru tal-CAS = Numru tal-Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-dimetilformammid; DMSO = dimetil sulfossidu; DNCB = 2,4-dinitroklorobenżen; EC3 = stima ta' konċentrazzjoni meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' 3; GP = riżultat tat-test fuq il-fenek tal-Indi (jiġifieri B. 6 jew il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13); HCA = eżil ċinnamaldeid; Lik = likwida; LLNA = riżultat tal-Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali tal-ġrieden (jiġifieri B. 42 jew il-Linja Gwida 429 tat-Test tal-OECD) (1); MEK = metil etil keton; NA = mhux applikabbli peress li l-indiċi ta' stimulazzjoni huwa ta' < 3; NC = mhux ikkalkolata peress li d-dejta nkisbet minn studju wieħed; Sol = solida; Veh = mezz tat-test.

(*) Ġie supponut li s-sustanza mhijiex sensitizzatur fil-bnedmin minħabba l-fatt li ma nstabu l-ebda riżultati mit-test kliniku bl-impjastri (clinical patch test), mhijiex inkluża bħala allerġen fis-sett tat-test bl-impjastri, u ma nstabu l-ebda rapporti ta' każijiet ta' sensitizzazzjoni fil-bnedmin.

(**) Mhijiex disponibbli d-dejta mill-GP (fenek tal-Indi).

(1) Is-sustanzi kimiċi għandhom jitħejjew ta' kuljum sakemm id-dejta ta' stabbiltà ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin.

(2) Minħabba l-impatt potenzjali ta' mezzi differenti fuq il-prestazzjoni tal-LLNA, għandu jintuża l-mezz rakkomandat għal kull sustanza kimika ta' referenza (24) (32).

(3) Il-valur medju fejn kien hemm disponibbli aktar minn valur wieħed tal-EC3. Għal sustanzi negattivi (jiġifieri bl-indiċi ta' stimolazzjoni < 3), hija pprovduta l-ogħla konċentrazzjoni ttestjata.

(4) Għadd ta' studji tal-LLNA li minnhom inkisbet id-dejta.

(5) Kummerċjalment disponibbli bħala Kathon CG (Nru tal-CAS 55965-84-9), li hija taħlita ta' 3:1 ta' CMI u MI. Il-konċentrazzjonijiet relattivi ta' kull firxa ta' komponenti minn 1,1 % sa 1,25 % (CMI) u 0,3 % sa 0,45 % (MI). Il-komponenti inattivi huma sustanzi tal-melħ tal-manjeżju (21,5 % sa 24 %) u nitrat tar-ram (0,15 % sa 0,17 %), bil-formulazzjoni li jifdal ta' 74 % sa 77 % ilma. Kathon CG hija disponibbli minnufih mingħand Sigma-Aldrich u Rohm and Haas (issa, Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Standards ta' affidabbiltà u preċiżjoni ddefiniti**

7. Il-preċiżjoni ta' metodu LLNA simili jew modifikat għandha tissodisfa jew taqbeż dik tal-PS tal-LLNA meta dan jiġi evalwat permezz tat-18-il sustanza kimika ta' referenza minimi li għandhom jintużaw. Il-metodu l-ġdid jew modifikat għandu jirriżulta fil-klassifikazzjoni korretta fuq il-bażi ta' deċiżjoni ta' "iva jew le". Madankollu, il-metodu l-ġdid jew modifikat jista' ma jikklassifikax b'mod korrett is-sustanzi kimiċi ta' referenza minimi kollha li għandhom jintużaw. Jekk, pereżempju, wieħed mis-sensitizzaturi dgħajfa jiġi kklassifikat ħażin, tista' titqies raġuni għall-klassifikazzjoni żbaljata u dejta addizzjonali adattata (pereżempju riżultati tat-test li jipprovdu klassifikazzjonijiet korretti għal sustanzi oħra b'karatteristiċi fiżiċi, kimiċi u sensitizzanti simili għal dawk tas-sustanza kimika ta' referenza klassifikata ħażin) sabiex tintwera prestazzjoni ekwivalenti. F'dawn iċ-ċirkostanzi, l-istatus ta' validazzjoni tal-metodu ta' ttestjar LLNA l-ġdid jew modifikat jiġi evalwat każ b'każ.

Riproduċibbiltà intralaboratorja

8. Sabiex tiġi stabbilita r-riproduċibbiltà intralaboratorja, metodu LLNA ġdid jew modifikat għandu jiġi eżaminat billi tintuża sustanza sensitizzanti li hija karatterizzata sew fl-LLNA. Għaldaqstant, il-PS tal-LLNA huma bbażati fuq il-varjabbiltà tar-riżultati minn testijiet ripetuti ta' eżil ċinnamaldeid (HCA). Sabiex tiġi eżaminata l-affidabbiltà intralaboratorja, il-limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt – treshold Estimated Concentration) għall-HCA għandhom jinġiebu minn erba' okkażjonijiet separati tal-inqas b'ġimgħa bejn it-testijiet. Riproduċibbiltà intralaboratorja aċċettabbli hija indikata mill-abbiltà tal-laboratorju li f'kull test tal-HCA jikseb il-valuri tal-ECt ta' bejn 5 % u 20 %, li jirrappreżentaw il-firxa ta' 0,5-2,0 darbiet l-EC3 medja speċifikata għall-HCA (10 %) fl-LLNA (ara t-Tabella 1).

Riproduċibbiltà interlaboratorja

9. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja ta' metodu LLNA ġdid jew modifikat għandha tiġi eżaminata billi jintużaw żewġ sustanzi sensitizzanti li huma karatterizzati sew fl-LLNA. Il-PS tal-LLNA huma bbażati fuq il-varjabbiltà tar-riżultati minn testijiet tal-HCA u 2,4-dinitroklorobenżen (DNCB) f'laboratorji differenti. Il-valuri tal-ECt għandhom jinġiebu b'mod indipendenti minn studju wieħed imwettaq tal-inqas fi tliet laboratorji separati. Sabiex tintwera r-riproduċibbiltà interlaboratorja aċċettabbli, kull laboratorju għandu jikseb il-valuri tal-ECt ta' 5 % sa 20 % għall-HCA u ta' 0,025 % sa 0,1 % għad-DNCB, li jirrappreżentaw il-medja ta' 0,5-2,0 darbiet il-konċentrazzjonijiet medji tal-EC3 speċifikati għall-HCA (10 %) u d-DNCB (0,05 %), rispettivament, fl-LLNA (ara t-Tabella 1).

▼M3

Appendiċi 2

Definizzjonijiet

Preċiżjoni: Il-viċinanza tal-qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija miżura ta' prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u aspett wieħed ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (14).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni li huwa indikattiv ta' rispons pożittiv.

Konċentrazzjoni stmata ta' tlieta (EC3): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' tlieta.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala negattiva jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl sa fejn il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hija ddeterminata matul il-proċessi ta' validazzjoni u ta' validazzjoni minn qabel, u tindika sa fejn test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (14).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (14).

Test "me-too": Espressjoni li tingħad fit-taħdit komuni għal metodu ta' ttestjar li huwa strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' referenza validat u aċċettat. Metodu ta' ttestjar bħal dan ikun kandidat għal validazzjoni rapida ("catch-up validation"). Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili (14).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħra f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Standards ta' Prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li huwa simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi: (i) komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati sabiex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' preċiżjoni u affidabbiltà, ibbażati fuq x'inkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta jiġi evalwat billi tintuża l-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (14).

Metodu ta' ttestjar ta' speċjalità: Metodu ta' ttestjar li l-manifattura u d-distribuzzjoni tiegħu huma ristretti minn privattivi, drittijiet tal-awtur, marki kummerċjali, eċċ.

▼**M3**

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li skontu jiġu vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Sustanzi kimiċi ta' referenza: Sustanzi kimiċi magħżula għall-użu fil-proċess ta' validazzjoni, li għalihom huma diġà magħrufa r-reazzjonijiet fis-sistema ta' ttestjar ta' referenza *in vitro* jew *in vivo* jew l-ispeċi ta' interess. Dawn is-sustanzi kimiċi għandhom ikunu rappreżentanti tal-klassijiet ta' sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni jintuża l-metodu ta' ttestjar, u dawn għandhom jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' reazzjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mis-sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni li jintuża dan il-metodu ta' ttestjar, minn qawwija, għal dgħajfa, sa negattivi. Settijiet differenti ta' sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa għall-istadji differenti tal-proċess ta' validazzjoni, u għal metodi ta' ttestjar u użi tat-testijiet differenti (14).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-konsiderazzjoni tal-preċiżjon (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (14).

Affidabbiltà: Kejl li jiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fi ħdan u bejn il-laboratorji maż-żmien, meta dan jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hija eżaminata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà intralaboratorja u dik interlaboratorja (14).

Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku induttur, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jeżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dik fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li hija msemmija wkoll sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih tlestew studji ta' validazzjoni sabiex jiġu ddeterminati r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabbiltà għal skop speċifiku. Huwa importanti li jiġi osservat li metodu ta' ttestjar validat jista' ma jkollux prestazzjoni suffiċjenti f'termini ta' preċiżjoni u affidabbiltà sabiex jitqies aċċettabbli għall-iskop propost (14).

▼B

B.43. **STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSIĊITÀ FL-ANNIMALI GERRIEMA**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għal OECD TG 424 (1997)

Dan il-Metodu tat-test kien ġie ddisinjat sabiex jakkwista l-informazzjoni meħtieġa ħalli jikkonferma jew aktar jikkaratterizza l-potenzal tan-newrotossiċità ta' kimika f'annimali adulti. Jista' jkun jew imwettaq flimkien mal-Metodi tat-Test eżistenti dwar l-istudji tat-tossiċità għal doża repetuta jew li jkun imwettaq bħala studju separat. Huwa rakkommandat li il-OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) jkun ikkonsultat sabiex jgħin fid-disinn ta' l-istudji bbażati fuq dan il-metodu ta' Test. Dan huwa partikolarment importanti meta modifiki ta' l-osservazzjonijiet u tal-proċeduri tat-test kif rakkommandat għall-użu b'rutina ta' dan il-metodu jkunu kkonsidrati. Id-Dokument ta' Gwida kien ġie ippreparat sabiex jiffaċilita l-għażla ta' proċeduri oħrajn tat-test għall-użu f'ċirkostanzi speċifiċi.

L-assess ta' l-iżvilupp newrotossiku mhux is-suġġett ta' dan il-Metodu.

1.1 INTRODUZZJONI

Fl-assess u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tal-kimika, huwa importanti li jkun ikkonsidrat il-potenzal ta' l-effetti newrotossiċi. Diġa fil-Metodu tat-test dwar tossiċità sistematika għal doża repetuta, jinkludi osservazzjonijiet li jħarsu dwar in-newrotossiċità potenzali. Dan il-Metodu ta' Test jista' jkun użat dabiex jiddisinja studju ħalli jakkwista aktar informazzjoni dwar, jew jikkonferma, l-effetti newrotossiċi, osservati fl-istudji tat-tossiċità sistematika f'doża repetuta. B'dana kollu, kunsiderazzjoni dwar in-newrotossiċità potenzali ta' klassijiet ta' kimika jistgħu jissuġġerixxu li dawn jistgħu ikunu evalwati aħjar bl-użu ta' dan il-metodu mingħajr indikazzjonijiet preċedenti tan-newrotossiċità potenzali minn studji tat-tossiċità sistematika minn doża repetuta. Uħud mill-kunsiderazzjonijiet jinklu, per eżempju:

— l-osservazzjoni ta' sinjali newroloġiċi jew feriti newropatoloġiċi fl-istudji tossiċi apparti milli l-istudji tat-tossiċità sustematika f'doża repetura, jew

— relazzjoni strutturali jew informazzjoni oħra li torbothom ma newrotossikanti magħrufa.

B'żieda jista' jkun hemm okkażżjonijiet oħrajn meta l-użu ta' dan il-metodu ta' test jista' jkun xieraq; għal aktar dettalji ara (1).

Dan il-Metodu kien ġie żviluppat sabiex ikun jista' jiġi mfassal ħalli jilħaq il-ħtiġiet partikolari sabiex jikkonferma l-ħistopatoloġija speċifika u n-newrotossiċità ta' l-imġieba ta' kimika kif ukoll jipprovdi karatterizzazzjoni u kwantifikazzjoni tar-reazzjonijiet newrotossiċi.

▼B

Fil-passat, in-newrotossiċità kienet imqabbla man-newropatija li tinvolvi feriti newropatoloġiċi jew disfunzjonijiet newroloġiċi, bħala ma huma attakk ta' puplesija, paraliżi jew roda. Għalkemm in-newropatija hija manifestazzjoni importanti tan-newrotossiċità, issa huwa ċar li hemm ħafna sinjali oħrajn tat-tossiċità tas-sistema nervuża (eż. it-telf tal-kordinament muturili, it-tnaqqis sensitorju, id-disfunzjonijiet fil-tgħallim u l-memorja) li jistgħu ma jkunux riflessi fl-istudji newropatiċi jew ta' tipi oħrajn.

Dan il-Metodu ta' Test newrotossiku huwa iddisinjat sabiex jiżvela newro-imġieba maġġuri u l-effetti newropatholoġiċi f'annimali gerriema adulti. Waqt l-effetti ta' l-imġieba, anki fin-nuqqas ta' tibdiliet morfoloġiċi, jistgħu jirreflettu fuq l-impatt ħażin ta' l-organiżmi, mhux it-tibdiliet ta' l-imġieba kollha huma speċifiċi għas-sistema nervuża. Għalhekk, xi tibdiliet osservati għandhom ikunu evalwati b'konnessjoni mad-dettalji ħistopatoloġiċi, ħematoloġiċi jew biokemikali korrelattivi kif ukoll l-informazzjoni dwar tipi oħrajn tat-tossiċità sistematika. It-testijiet meħtieġa b'dan il-metodu sabiex jipprovdu karatterizzazzjoni u kwantifikazzjoni tar-reazzjonijiet newrotossiċi jinkludu proċeduri ħistopatoloġiċi jew ta' l-imġieba speċifiċi li jitgħu aktar ikunu appoġġjati minn investigazzjonijiet elettrofiżjoloġiċi u/jew biokimiċi (1) (2) (3) (4).

In-newrotossikanti jistgħu jaġixxu fuq numru ta' miri fi ħdan is-sistema nervuża u b'varjetà ta' mekkaniżmi. La darba l-ebda medda ta' testijiet ma hija kapaċi li tassessja fil-profond il-potenzal newrotossiku tas-sustanzi kollha, jista' jkun meħtieġ li jkunu utilizzati testijiet *in vivo* jew *in vitro* oħrajn speċifiċi għat-tip tan-bewrotossiċità osservata jew antiċipata.

Dan il-Metodu tat-Test jista' jkun użat ukoll, b'konnessjoni mal-gwida stabbilita fid-Dokument ta' Gwida OECD dwar l-Istrateġiji u l-Metodi tat-testijiet Newrotossiċi (1) li huma iddisinjati bħala intiżi li aktar jikkaratterizzaw jew iżidu s-sensittività tal-kwantifikazzjoni tar-reazzjoni tad-doża sabiex ikun hemm estimi aħjar tal-livell ta' l-effet mhux-osservat-ħażin jew li jissustanzja perikoli magġrufa jew issusspetati tal-kimika. Per eżempju, l-istudji jistgħu ikunu iddisinjati li jidentifikaw u jevaljaw il-mekkaniżmi newrotossiċi jew li jissupplementaw l-informazzjoni diġa disponibbli mill-użu tal-proċeduri bażiċi fl-osservazzjoni newro-imġieba u newropatoloġiċi. Tali studji mhux bilfors li jiddupplikaw l-informazzjoni li tkun ġiet ġenerata mill-użu tal-proċeduri normali rakkommandati f'dan il-metodu jekk tali dettalji jkunu diġa disponibbli u li ma humiex meqjusa bħala meħtieġa għall-interpretazzjoni tar-riżultati ta' l-istudju.

Dan l-istudju newrotossiku, meta użat waħdu jew flimkien ma oħrajn, jipprovdi informazzjoni li tista':

— tidentifika jekk is-sistema nervuża tkun affettwata b'mod permanenti jew riversibbli mill-kimika ittestjata;

— tikkontiribwixxi l-karatterizzazzjoni tat-tibdiliet fis-sistema nervuża assoċċjati ma l-espożizzjoni lejn il-kimika, u dwar ir-rikonoxximent tal-mekkaniżmu bażiku;

▼B

— tiddetermina ir-relazzjoni tad-doża u tar-reazzjoni tal-ħin sabiex ikun ikkalkolat il-livell ta' l-effett ħażin mhux-osservat (li jista' jkun użat sabiex jista'bbilixxi kriterja b'sigurtà għall-kimika).

Dan il-Metodu ta' Test juża amministrazzjoni orali tas-sustanza tat-test. Rotot oħrajn ta' l-amministrazzjoni (eż. dermali jew man-nifs) jistgħu ikunu aktar xierqa, u jistgħu jeħtieġu modifika għall-proċessi rakkommandati. Konsiderazzjonijiet ta' l-għażla tar-rotta ta' l-amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-profil ta' l-espożizzjoni umana u l-informazzjoni disponibbli, tossikoloġika jew kinetika.

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Effett ħażin: Kwalunkwe alterazzjoni relatata mat-trattament minn linja bażi li tnaqqas l-abbiltà ta' l-organiżmu li jibqa ħaj, li jirriproduċi jew li jadatta għall-ambjent.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test kif somministrata. Id-doża hija espressa bħala piż (g. Mg) jew bħala piż tas-sustanza tat-test għal kul unità tal-piż ta' l-annimal tat-test (eż. mg/Kg), jew bħala konċentrazzjonijiet dietarju kostanti 9ppm).

Dożaġġ: Huwa terminu ġenerali li jinkluži d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

Newrotossiċità: Hija it-tibdil ħażin fl-istruttura jew fil-funzjoni tas-sistema nervuża li tirriżulta minn espożizzjoni lejn aġent kimiku, bioloġiku jew fiżiku.

Newrotassikant: Huwa l-aġent kimiku, bioloġiku jew fiżiku li jkollu l-potenzal li joħloq in-newrotossiċità.

NOAEL: Hija l-abbrevjazzjoni għall-livell ta' l-ebda effett avvers ma huwa osservabbli (no-observed-adverse-effect level) u hija l-għola doża jew livell ta' espożizzjoni meta l-ebda sejbiet avversi realatati mat-trattament ma jkunu osservati.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-kimika tat-test hija somministrata bir-rotta orali matul medda ta' dożi lil diversi gruppi ta' annimali gerriema tal-laboratorju. Dożi repetuti huma normalment maħtieġa, u r-regola tad-dożaġġ tista' tkun 18 jum, subkronika (90 jum) jew kronika (sena jew aktar). Il-proċeduri stabbilitu f'dan il-Metodu ta' test jistgħu wkoll ikunu użati għall-istudju tan-newrotossiċità akuta. L-annimali huma ittestjati sabiex jippermettu s-sejbien jew il-karatterizzazzjoni ta' l-imġieba u/jew l-annormalitajiet newroloġiċi. Medda ta' mġieba li tista' tkun affettwata bin-newrotossikanti hija assessjata matul kull perjodu ta' l-osservazzjoni. Fl-aħħar tat-test, subset ta' annimali ta' kull sess minn kull grupp huma mxerrda *in situ* u s-sezzjonijiet tal-moħħ, l-ispina dorsaali, u n-nervi periferali huma ippreparati u eżaminati.

Meta l-istudju jkun imwettaq bħala studju independenti sabiex jevalwa n-newrotossiċità jew li jikkaratterizza l-effetti newrotossiċi, l-annimali f'kull grupp ma li jkunux użati għat-tixrid u l-ħistopatoloġija sussegwenti 9 ara t-Tabella 1) jista' jkun użat għall-proċeduri newro-imġieba speċifika, n-newropatoloġija, in-newrokimika jew elettrofiżjoloġiċi li jistgħu jissupplementaw l-informazzjoni akkwistat mill-eżaminazzjonijiet normali meħtieġa b'daan il-Metodu (1). Dawn il-proċeduri supplementaji jistgħu ikunu partikolarment utili meta l-osservazzjonijiet empiriċi jew l-effetti mistennija jindikaw tip jew mira speċifika tan-newrotossiċità ta' kimika. B'mod alternattiv, il-kumplament ta' l-annimaali jistgħu ikunu użati għal evalwazzjonijiet bħal dawk mitluba fil-Metodi tat-testijiet għal studji tat-tossiċità f'doża repetuta fl-annimali gerriema.

▼B

Meta l-proċeduri ta' dan il-Metodu ta' Test huma miġbura ma dawk tal-metodi ta' testijiet oħrajn, numru suffiċċjenti ta' annimali huwa meħtieġ sabiex jissodisfa l-ħtiġiet għall-osservazzjonijiet taż-żewġ studji.

1.4 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

L-ispeċje preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċje oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Annimali żgħażagħ adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Id-dożaġġ għandu normalment jibda malajr kemm jista' jkun possibbli wara l-ftim, preferibbilemnt mhux aktar tard minn meta l-annimali jkollhom sitt ġimghat, u, fi kwalunkwe każ, qabel ma l-annimali jkunu għalqu d-disa' ġimghat. B'dana kollu, meta dan l-istudju jseħħ flimkien ma studji oħrajn, din il-ħtieġa ta' l-età tista' tkun teħtieġ aġġustament. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati għandha tkun minima u ma teċċedix 20 % tal-piż medju ta' kull sess. Meta studju ta' doża repetita ftul qasir ta' żmien ikun imwettaq bħala preliminarju għal studju f'terminu fit-tul, l-annimali mill-istess tiġ u sorsi għandhom ikunu użati fiż-żewġ studji.

1.4.2 **Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għan għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Ħsejjes għoljin intermittenti għandhom jinżammu għall-anqas possibbli. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata bil-ħtieġa li tkun assigurata inter-taħlita xierqa tas-sustanza tat-test meta somministrata b'dan il-metodu. L-annimali jistgħu jinżammu individwalment jew li jkunu f'gaġġa bħala grupp żgħir ta' l-istess sess.

1.4.3 **Preparazzjoni ta' l-annimali**

Annimali żgħażagħ b'saħħithom ikunu assenjati kif jinzerta għal gruppi ta' trattament u tal-kontroll. Il-gaġġeġ għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid fil-gaġġeġ ikunu minimizzat. L-annimali huma identifikati b'mod uniku u miżmuma fil-gaġġeġ tagħhom għal mill-anqas (5) ħamest ijiem qabel il-bidu ta' l-istudju sabiex jippermetti għall-akklamitizzazzjoni lejn il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

1.4.4 **Rotta ta' l-amministrazzjoni u l-preparazzjoni tad-doża**

Dan il-Metodu ta' Test juża amministrazzjoni orali tas-sustanza tat-test. L-amminstrazzjoni orali tista' tkun bi tmiegħ sfurzat, ma l-ikel, jew fl-ilma tax-xorb, jew b'kapsuli. Rotot oħrajn ta' l-amministrazzjoni (eż. dermali jew man-nifs) jistgħu ikunu aktar xierqa, u jistgħu jeħtieġu modifika għall-proċessi rakkommandati. Konsiderazzjonijiet ta' l-għażla tar-rotta ta' l-amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-profil ta' l-espożizzjoni umana u l-informazzjoni disponibbli, tossikoloġika jew kinetika. Ir-raġġjunar għall-għażla tar-rotta ta' l-aamministrazzjoni kif ukoll il-modifiki li jirriżultaw għall-proċeduri ta' dan il-metodu ta' test għandhom ikun indikati.

▼B

Meta meħtieġ, is-sustanza tat-test tkun imdewwba jew sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkommandat li, kull meta possibbli, l-użu ta' taħlita/sospenzjoni akwea tkun meqjusa bħala l-ewwel għażla, sewgeita bil-kunsiderazzjoni ta' taħlita/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħirrum) w imbagħad b'xi taħlita oħra f'mezzi oħrajn. Il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz għandhom ikun u magħrufa. B'żieda, kunsiderazzjoni għandha tingħata għal dawn il-karatteristiċi li ġejjin dwar il-mezz: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu joħolqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ima jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.5 PROĊEDURI

1.5.1 **Numru u sess ta' l-annimali**

Meta l-istudju jkun imwettaq bħala studju separat, mill-anqas 20 annimal (10 nisa u 10 irġiel) għandhom ikunu użati għal kull grupp tad-doża u tal-kontroll għall-evalwazzjoni ta' l-osservazzjonijiet dettaljarti kliniċi u funzjonali. Mill-anqas ħamest irġiel u ħames nisa, magħżula minn dawk l-10 tirġiel u l-għaxar nisa, għandhom ikunu mxerrda *in situ* u użati għall-newroħistopatoloġija dettaljata fit-tmiem ta' l-istudju. Fil-każi meta numru limitat biss ta' annimali jkunu mogħti d-doża fil-grupp osservat għas-sinjal ta' l-effetti newrotossiċi, kunsiderazzjoni għandha tkun mogħtija għall-inklużjoni ta' dawn l-annimali f'dawk magħżula għat-tixrid. Meta l-istudju jkun imwettaq flimien ma l-istudju tat-tossiċità ta' doża repetuta, numru adekwat ta' annimali għandu jkun użat sabiex jilħaq l-għanijiet taż-żewġ studju. In-numru minimu ta' annimali f'kull grupp għad-diversi ġemgħat ta' studji huwa mogħti fit-tabella 1. Jekk sa dan it-tant ikun hemm qtil jew gruppi ta' rkupru għall-osservazzjoni tar-riversabbiltà, l-persistenza jew l-okkorrenza mdewma ta' l-effetti tossiċi ta' wara t-trattament, ikunu ippjanati jew meta osservazzjonijiet supplementarji jkunu ikkonsidrati, allura n-numru ta' l-annimali għandu jkun miżjud sabiex jassigura li n-numru ta' l-anniamli meħtieġa għall-osservazzjoni u l-ħistopatoloġija jkunu disponibbli.

1.5.2 **Grupp ta' trattament u tal-kontroll**

Mill-anqas tlett gruppi ta' doża u grupp tal-kontroll għandhom ġeneralment ikunu użati, imma jekk mill-assessjar ta' informazzjoni oħra, l-ebda effetti ma jkunu mistennija fid-doża repetuta ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, tast ta' limitu jkunu jkun imwettaq. Jekk ma jkun hemm l-ebda informazzjoni disponibbli, medda ta' studju tas-sejbien tista' tkun imwettqa sabiex tgħin fid-determinazzjoni tad-doži li għandhom ikunu użati. Apparti milli għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ukoll ikunu mqandla b'manjera identika għas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk ikun użat mezz, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi il-mezz fl-għola volum użat.

1.5.3 **Verifika ta' l-affidabbiltà**

Il-laboratorju li jwettaq l-istudju għandu jippreżenta informazzjoni li turi il-kapaċità tiegħu li jwettaq l-istudju u s-sensittività tal-proċeduri użati. Tali informazzjoni għandha tipprovdi evidenza ta' l-abbiltà li jiżvela u jikkwantifika, kif xieraq, tibdiliet fl-għanijiet finali differenti kif rakkommandati għall-osservazzjoni, bħal ma huma sinjali awtomatiki, reattività sensorja, is-saħħa tal-qabda fid-dirgħajn u s-saqajn u l-attività motorili. L-informazzjoni dwar il-kimika li tikkawża tipi differenti ta' reazzjonijiet newrotossiċi u jistgħu ikunu użati bħala kontroll pożittiv tas-sustanzi jista' jinstgħab fir-referenzi 2 sa 9. L-informazzjoni storika tista' tkun użata jekk l-aspetti essenzali tal-proċeduri. Sperimentali jibqgħu l-istess. Aġġornament perjodiku ta' l-informazzjoni storika huwa rakkommandat. Informazzjoni ġdida li turi s-sensittività kontinwa tal-proċeduri għandha tkun żviluppata meta uħud mill-elementi essenzali ta' l-imġieba tat-test jew tal-proċeduri tkun ġiet mibdula mill-laboratorju li jwettaq l-istudji.

▼B

1.5.4 **L-għażla tad-doża**

Il-livelli tad-doża għandhom ikunu magħżula billi tkun meqjusa xi informazzjoni preċedentament osservata tat-tossiċità u l-kinetika disponibbli għall-kompost tat-test jew tal-materjali relatati. L-għola livell tad-doża għandu jkun magħżul bil-għan li jinduċi effetti newrotossiċi jew effetti ċari sistematikament tossiċi. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħżulha bil-għan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett ħażin mhu osservat (NOAEL). Bħala prinċipju, il-livelli tad-doża għandhom ikunu hekk stabbiliti sabiex primarjament l-effetti tossiċi fuq is-sistema nervuża jistgħu ikunu distingwiti mill-effetti relatati mat-tossiċità sistematika. Tnejn sa erba' intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożi. Meta jkun hemm estimi raġjonevili ta' espożizzjoni umana, dan għandu jkun meqjus.

1.5.5 **Test tal-limitu**

Jekk l-istudju fl-livell ta' doża ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem.kull jum, li juża l-proċeduri deskritti, ma jipproduċi l-ebda effetti newrotossiċi u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija meta ibbażata fuq l-informazzjoni mill-komposti strutturament relatati, allura studju sħiħ li juża tlett livelli ta' dożi jista' li ma jkunx meqjus bħala meħtieġ. L-isposizzjoni umana mistennija tista' tindika il-ħtieġa għal-livell ta' doża orali għola li tkun użata fit-test tal-limitu. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma hija l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza tat-test, bħal kemm tinħall, ta' spiss tista' tindika u tillimita l-livell massimu attenibbli ta' l-espożizzjoni. Għat-twettieq ta' studju akut orali, id-doża tat-test tal-limitu għandha tkun ma mill-anqas 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Amministrazzjoni tad-dożi**

L-annimali huma mogħtija d-doża bis-sustanza tat-test, ta' kull jum, sebat ijiet kull ġimgħa, għal perjodu ta' mill-anqas 28 jum; l-użu tar-regola tad-doża ta' ħamest ijiem jew perjodu ta' espożizzjoni aqsar, jeħtieġ li jkunu ġustifikati. Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doża waħda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi inubazzjoni canula xierqa. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux jeċċedi 1 ml/100 g piż tal-ġisem. b'dana kollu fil-każ ta' taħlitiet akweji, 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem jista' jkun ikkonsidrat. Apparti milli għal sustanzi irritanti jew korrossivi, li normalment ikununjiżvelaw effetti eżasperanti b'konċentrazzjonijiet għola, varjabbilità fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni sabiex tassigura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

Għal sustanzi amministrati permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, huwa importanti li jkun assigurat li l-kwantitajiet tas-sustanza tat-test kif involuti ma jkunux jinterferixxu man-nutriment normali jew mal-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata fid-dieta, konċentrazzjoni djetarja kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal, jista' jkun użat; il-mod alternattiv użat għandu jkun speċifikat. Għal sustanza somministrata bi tmiegħ sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija f'ħinijiet simili ta' kull jum, u aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa sabiex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Meta l-istudju tad-doża repetuta ikun użat bħala preliminarju għal studju f'terminu fit-tul, dieta simili għandha tkun użata fiż-żewġ studji. F'ċirkostanzi mhuix tas-solti li fihom doża waħda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix l-24 siegħa.

▼B

1.6 OSSERVAZZJONIJIET

1.6.1 **Frekwenza ta' l-osservazzjonijiet u t-testijiet**

Fi studji ta' doża repetuta, il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkopri l-perjodu tad-dożaġġ. Fi studju akuti, perjodu ta' 14-il jum post-trattament, għandu jkun osservat. Għall-annimali fi gruppi satteliti li huma miżmuma mingħajr espożizzjoni matul perjodu tal-post-trattament, l-osservazzjonijiet għandhom ikopru wkoll dan il-perjodu.

L-osservazzjonijiet għandhom isiru fi frekwenza suffiċjenti sabiex iqawwu l-probabbilità tas-sejbien ta' xi annormalitajiet fl-imġieba u/jew fin-newroloġija. L-osservazzjonijiet għandhom, preferibbilment, isiru fl-istess ħinijiet ta' kull jum b'kunsiderazzjoni mogħtija għall-perjodu l-aktar qawwi ta' l-effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-frekwenza ta' l-osservazzjonijiet kliniċi u tat-testijiet funzjonali huma miġbura f'sommarju fit-Tabella 2. Jekk informazzjoni kinetika jew informazzjoni oħra minn studji preċedenti tindika il-ħtieġa ta' l-użu ta' punti differenti tal-ħon, it-testijiet jew il-perjodu post-osservazzjoni, skeda alternattiva għandha tkun adotta sabiex tkun akkwistata l-informazzjoni massima. Ir-raġunar għal tibdil ta' l-iskeda għandu jkun ipprovdut.

1.6.1.1 *Osservazzjonijiet dwar il-kundizzjonijiet ġenerali tas-saħħa u tal-mortalità/morbidità*

L-annimali kollha għandhom ikunu osservati bir-reqqa mill-anqas darba kull jum fir-rigward tal-kundizzjoni tas-saħħa tagħhom kif ukoll mill-anqas darbtejn kull jum dwar il-morbidità u l-moralità.

1.6.1.2 *Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati*

Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru fuq l-annimali kollha magħżula għal dan l-iskop (ara t-Tabella 1), darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex jippermetti għal paraguni fi ħdan is-suġġett), u f'ħinijiet differenti minn hemm il-quddiem, jiddependi mit-tul ta' l-istudju (ara t-Tabella 2). Osservazzjoni kliniċi dettaljati fuq gruppi satellita ta' l-irkupru għandhom isiru fit-tmiem tal-perjodu ta' l-irkupru. Osservazzjoni kliniċi dettaljati għandhom isiru il-barra mill-gaġġa ta' fejn jinżammu f'arena normali. Dawn għandhom ikunu reġistrati bir-reqqa bl-użu ta' sistemi tal-marki li jinkludi kriterja jew skali tal-marki għal kull kejl fl-osservazzjonijiet. Il-kriterja jew l-iskali użati għandhom ikunu spliċitament definiti mil-laboratorju tat-test. Sforz għandu jsir sabiex jassigura li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test ikunu minimi (mhux sistematikament relatati mat-trattament) u li l-osservazzjonijiet ikunu mwettqa minn osservaturi mħarrġa li ma jkunux konxi bit-trattament attwali.

Huwa rakkommandat li l-osservazzjonijiet ikunu mwettqa f'għamla strutturali li fiha kriterja ben definita (inkluża d-definizzjoni tal-"medda" normali) ikunu sistematikament applikati ma kull annimal fuq waqt ta' l-osservazzjon. Il-"medda normali" għandha tkun adekwatament dokumentata. Is-sinjali osservati kollha għandhom ikunu reġistrati. Kull meta prattikabbli, il-magnitudini tas-sinjali osservati għandhom ukoll ikunu rekordjati. L-osservazzjonijiet kliniċi għandhom jinkludu, imma ma jkunx limitati għall-ambjament fil-ġilda, fis-suf, fl-għajnejn, fil-membrani mukoża, fl-okkorrenza tas-sekrazzjonijiet u tal-ħmieġ u l-attività awtomatika

▼B

(eż. lakrimazzjoni, piloerezzjoni, id-daqs tal-pupilla, għamla repiratorja mhux normali u/jew in-nifs mill-ħalq, xi sinjali mhux tas-soltu ta' l-urina jew tal-qlalet, u urina b'kulur stramb). Xi reazzjonijiet mhux tas-soltu fir-rigward tal-pożissjoni tal-ġisem, il-livell ta' l-attività (eż. tnaqqis jew żieda fl-esplorazzjoni fl-arena normali) u l-kordinament tal-moviment, għandhom ukoll ikunu innotati. Tibdil fil-mixi (eż. xengil, atassja), il-posizzjoni (eż. b'darhom mgħawweġ) u r-reattività għat-tqandil, it-tqegħid jew stimulu ambjentali oħraajn, kif ukoll il-preżenta ta' movimenti kloniċi jew toniċi, konvulżjonijiet jew rogħda, stereotipi (eż. kura żejda, movimenti mhux normali tar-ras, dawrien repetittiv) jew imġieba stramba (eż. gdim jew li jilgħaqu b'mod eċċessiv, mutilazzjoni tagħhom stess, mixi lura, vokalizzazzjoni) jew aggressjoni għandhom ikunu rekordjati.

1.6.1.3 *Testijiet funzjonali*

L-istess bħall-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati, it-testijiet funzjonali għandhom ukoll ikunu mwettqa qabel l-espożizzjoni preċedenti u ta' spiss minn hemm il-quddiem fuq l-annimali kollha magħżula għal dan l-iskop (ara t-Tabella 1) Il-frekwenza tat-testijiet funzjonali hija wkoll dipendenti fuq it-tul ta' l-istudju (ara t-Tabella 2). B'żieda mal-perijodi ta' l-osservazzjoni kif elenkati fit-Tabella 2, l-osservazzjonijiet funzjonali fuq gruppi satellita ta' l-irkupru għandhom ukoll isiru malajr kemm jista' jkun possibbli lejn il-qtil tat-terminazzjoni. It-testijiet funzjonali għandhom jinkludu ir-reattività sensitorja għall-istimu ta' diversi modalitajiet, eż. l-istimuli awditorji, viżwali u proprjoseptivi (5)(6)(7)), bl-assaġġ tal-forza tad-dirgħajn u s-saqajn (8) u l-assaġġ ta' l-attività motorili (9). L-attività motorili għandha tkun imkejjla b'apparat awtomatiku li jkun kapaċi jiżvela kemm it-tnaqqis u wkoll iż-żidiet fl-attività. Jekk tkun użata sistema definita oħra, din għandha tkun kwantitattiva u s-sensittività u l-affiddabbilità tagħha għandhom ikunu demonstrati. Kull apparat għandu jkun ittestjat sabiex jassigura affiddabbilità matul iż-żmien u li jkun konsistenti bejn l-apparati. Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu ikunu segwiti huma mogħtija fir-referenzi rispettivi. Jekk ma jkun hemm l-ebda informazzjoni (eż. attività strutturali, dettalji epidemjoloġiċim studju tossikoloġiċi oħrajn(sabiex jindikaw l-effetti newrotossiċi potenzali, l-inklużjoni ta' aktar testijiet speċjalizzati tal-funzjoni sensitorja u motorili jew tat-tgħallim u tal-memorja, sabiex jeżaminaw dawn l-effetti possibbli f'aktar dettall, għandhom ikunu ikkonsidrati. Aktar informazzjoni dwar testijiet speċjalizzati u l-użu tagħhom hija disponibbli fi (1).

B'mod eċċezzjonali, l-annimali li jiżvelaw sinjali ta' tossiċità sal-limitu li din tkun sinifikament tfixkel it-test funzjonali, dawn jistgħu jitħallew barra mit-test. Ġustifikazzjoni għall-eliminazzjoni ta' l-annimali minn test funzjonali għandha tkun ipprovduta.

1.6.2 **Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/ilma**

Għal studju ta' sa 90 jum, l-annimali kollha għandhom ikunu miżuna mill-anqas darba fil-ġimgħa u l-kejl għandu jittieħed tal-konsum ta' l-ikel (konsum ta' l-ilma, meta s-sustanza tat-test hija somministrata b'dik il-medja) mill-anqas darba fil-ġimgħa. Għal studji fit-tul, l-annimali kollha għandhom ikunu miżuna mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull 4 ġimgħat minn hemm il-quddiem. Il-kejl għandu jsir fuq il-konsum ta' l-ikel (il-konsum ta' l-ilma, meta s-sustanza tat-test hija somministrata b'dik il-medja) mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13 il-ġimgħa u imbagħad f'madwar intervalli ta' tlett-xhur, sakemm l-istat tas-saħħa jew tat-tibdiliet fil-piż tal-ġisem jiddettaw mod ieħor.

▼B

1.6.3 **Optalmoloġija**

Għal studji itwal minn 28 jum, l-eżaminazzjoni optalmoloġika, bl-użu ta' optalmoskopju jew strument ekwivalenti addattat, għandha ssir qabel l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test u fit-terminazzjoni ta' l-istudju, preferibbilment fuq l-annimali kollha, imma mill-anqas fuq l-annimali f'doża għolja u l-gruppi ta' kontroll. Jekk tibdiliet fl-għajnejn ikunu żvelati, jew, jekk sinjali kliniċi jindikaw il-ħtieġa, l-annimali kollha għandhom ikunu ezaminati. Għal studji fit-tul, eżaminazzjoni optalmoloġika għandha titwettaq mat-13-il ġimgħa. L-eżaminazzjonijiet optalmoloġiċi ma humiex meħtieġa jekk din l-informazzjoni tkun diġa disponibbli minn studji oħrajn ta' tul simili u f'livelli ta' doża simili.

1.6.4 **Hematoloġija u l-biokemistrija klinika**

Meta l-istudju newrtossiku jkun imwettaq flimkien ma studju tossiku sistematiku b'doża repetuta, l-eżaminazzjonijiet ħematoloġiċi u d-determinazzjoni tal-biokemistrija klinika għandhom jitwattqu kif elenkat fil-Metodu rispettiv ta' l-istudju tossiku sistematiku. Il-ġbir tal-kampjuni għandu jkun imwettaq b'tali mod li xi effetti potenzali fuq in-newro-imġieba jkunu minimizzati.

1.6.5 **Histopatoloġija**

L-eżaminazzjoni newropatoloġika għandha tkun iddisinjata sabiex tikkumplementa u testendi l-opsservazzjonijiet magħmula matul il-fażi *in vivo* ta' l-istudju. Siltiet minn mill-anqas 5 annimali/sess/-grupp (ara t-Tabella 1 u l-paragrafu li ġej) għandhom jitwettqu *in situ*, bl-użu ta' perfużjoni ġenerali rikonoxxuta u t-teknika tal-fissazzjoni (ara r-refernza 3, il-kapitolu 5 u r-referenza 4, il-kapitolu 50). Kwalunkwe tibdiliet kbar osservabbli għandhom ikunu irreġistrati. Meta l-istudju jkun imwettaq bħala aspett ta' l-istudju waħdu dwar in-newrotossiċità hew sabiex jikkaratterizza l-effetti newrotossiċi, il-kumplament ta' l-anniamli jistgħu ikunu użati jew għal newro-imġieba speċifika (10) (11), newropatoloġija (10) (11) (12) (13), mewrokimika (10) (11) (14) (15) jew elettropsikoloġija (10) (11) (16) (17), proċeduri li jistgħu jissupplementaw il-proċeduri u l-eżaminazzjonijiet deskritti hemmhekk, jew sabiex iżidu in-numru ta' suġġetti eżaminati għall-ħistopatoloġija. Dawn il-proċeduri supplementaji jistgħu ikunu partikolarment utili meta l-osservazzjonijiet empiriċi jew l-effetti mistennija jindikaw tip jew mira speċifika tan-newrotossiċità ta' kimika. B'mod alternattiv, il-kumplament ta' l-annimali jistgħu wkoll ikunu użati għal evalwazzjoni patoloġiċi ta' rutina kif deskritt fil-Metodu għal studju ta' doża repetuta.

Proċedura ta' tbgħajja ġenerali, bħal ma hija l-ħematossilin u l-eosin (H&E), għandha tkun imwettqa fuq il-kampjuni tal-biċċiet kollha mgħaddsa fil-paraffin, u eżaminazzjoni mikroiskopika għandha tkun imwettqa. Jekk ikunu osservati sinjali ta' newropatija periferali, jew jekk dawn ikunu issusspetati, kampjuni mgħaddsa fil-plastika tan-nisġa tal-nervu periferali, għandha tkun eżaminata. Sinjali kliniċi jistgħu wkoll jissuġġerixxi siti addizzjonali għall-eżaminazzjoni jew l-użu ta' proċeduri speċjali tat-tbgħajja. Gwida dwar siti addizzjonali tista’ tinsab fi (3) (4). Tbgħajja speċjali xierqa sabiex jurutipi speċifiċi tat-tibdil patoloġiku jistgħu wkoll ikunu ta' għajnuna (18).

▼B

Sezzjonijiet rapreżentattivi tas-sistema nervuża ċentrali u periferali għandhom ikunu eżaminati b'mod ġistoloġiku (ara r-referenza 3, il-kapitolu 5 u r-referenza 4, il-kapitolu 50). Iż-żoni eżaminati għandhom normalment jinkludu: Il-parti ta' quddiem tal-moħħ, iċ-ċentru tal-cerebrum, inkluża sezzjoni matul il-hippocampus, il-moħħ fin-nofs, il-cerebellum, il-pons, il-medulla oblongata, l-għajnejn bin-nerv ottiku u r-retina, l-ispina dorsali u t-tinfieħ ċervikali u lumbari, il-gangilja ta' l-għerq dorsali, il-fibri dorsali u vetrali, in-nerv xjatiku prossimali, innerv tibjali prossimati (fl-irkoppa) u n-nerv tibjali fil-frieħi tal-musolu tal-pexxun. L-ispina dorsali u s-sezzjonijiet tan-nervi periferali għandhom jinkludu s-sezzjonijiet laterali jew transversjali u longitudinali. Attenzjoni għandha tkun mogħtija għas-sistema vaskulaturali u nervuża. Kampjun tal-muskolu skeletali, partikolarment il-muskolu tal-pexxun, għandu wkoll ikun eżaminat. Attenzjoni speċjali għandha tingħata lis-siti bi struttura ċellullari u fibruża u d-disinn fil-CNS u il-PNS magħrufa li huma partikolarment affettwati bin-newrotossikanti,

Gwida dwar l-alterazzjonijiet newropatologikali li tipikament jirriżultaw minn espożizzjoni tossika jistgħu jinstabu fir-referenzi (3) (4). Eżmai ta' pass b'pass tal-kampjuni tal-biċċiet huwa rakkommandat li fih is-sezzjonijiet minn grupp ta' doża għolja jkunu l-ewwel paragunati ma dawk tal-grupp ta' kontroll. Jekk l-ebda tibdiliet newropatoloġikali ma jkunu osservati fil-kampjuni minn dawn il-gruppi, analiżi sussegwenti ma tkunx meħtieġa. Jekk alterazzjonijiet newropatoloġiċi jkunu osservati fil-grupp ta' doża għolja, il-kampjun minn kull nisġiet potenzalment affettwati, mill-gruppi tad-doża medja jew baxxa, għandhom imbagħad ikunu kodifiklati u sekwenzalment eżaminati.

Jekk xi evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġikali tkun misjuba fl-eżaminazzjoni kwalitattiva, allura it-tieni eżaminazzjoni għandha tkun imwettqa fuq ir-reġjuni kollha tas-sistema nervuża li turi dawn l-alterazzjonijiet. Sezzjonijiet mill-gruppi tad-doži kollha minn kull reġjun potenzalment affettwat għandhom ikunu kodifikati u eżaminati kif jinzerta mingħajr ma tkun magħrufa l-kodiċi. Il-frekwenza u s-severità ta' kull ferita għandha tkun reġistrata. Wara li r-reġjuni kollha mill-gruppi tad-doži kollha jkunu ġew iggradati, il-kodiċi tista' tkun żvelata ul-analiżi statistika mwettqa sabiex tevalwa r-relazzjonijiet doża-reazzjoni. Eżempji tal-gradi differenti tas-severità ta' kull ferita għandhom ikunu deskritti.

Is-sejbiet newroġatoloġiċi għandhom ikunu evalwati fil-kuntest ta' l-osservazzjoni u l-kejl ta' l-imġieba, kif ukoll xi informazzjoni oħra mill-istudji preċedenti u konkorrenti tat-tossiċità sistematika dwar is-sustanza tat-test.

2. **DATA**

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Data ta' l-annimal individwali għandha tkun ipprovduta. B'żieda, l-informazzjoni kollha għandha tkun miġbura f'sommarju, f'għamla tubulati, li turi għal kull test jew għal kull grupp, in-numru ta' l-annimali fil-bisu tat-test, in-numru ta' l-annimali misjuba mejta waqt it-test jew dawk maqtula għal raġunijiet umanitarji, u l-ħin tal-mewt jew tal-qtil umanitarju, in-numru li juru sinjali ta' tassiċità, deskrizzjoni tas-sinjali tat-tossiċità osservati, inkluż il-ħin ta' meta jiskoppjaw, it-tul tal-ħin, it-tip u s-seviritá ta' effetti tossiċi, in-numru ta' l-annimali li jkollhom feriti, inklużi t-tipi u s-severità tal-feriti.

▼B

2.2 EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Is-sejbiet ta' l-istudju għandhom ikunu evalwati f'termini ta' l-inċidenza, severità u korrelazzjoni ta' l-effetti newro-imġieba u newropatoloġiċi (l-effetti bewrokimiċi jew elettrofiżjoloġiċi kif ukoll jekk l-eżaminazzjonijiet supplementari huma nkluži) u xi effetti ħżiena oħrajn li jkunu osservati. Meta possibbli, r-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati bil-metodu xieraq u ġeneralment statistikament aċċettabbli. Il-motodi statistiċi għandhom ikunu magħżula matul id-disinn ta' l-istudju.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1 RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika (inkluži l-propjetajiet iżomeriċi, l-purità u fiżikokimiċi);

— dettalji ta' l-identifikazzjoni.

Mezz (jekk applikabbli):

— il-ġustifikazzjoni tal-mezz użat.

Annimali tat-test:

— speċje/tipi użati;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar is-sustanza tat-test, fomulazzjoni/preparazzjoni tad-dieta, Il-konċentrazzjoni akkwistata, l-istabbilità u l-omoġenità tal-preparazzjoni;

— speċifikazzjonijiet tad-doži amministrati, inkluži d-dettalji tal-mezz, il-volum u l-għamla fiżika tal-materjal amministrat;

— dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;

— ir-raġġjonar tar-rotta u t-tul ta' żmien ta' l-espożizzjoni;

— skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-konċentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali (mg/kg il-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Osservazzjoni u proċedura tat-test:

— dettalji ta' l-assenjar ta' l-annimali lejn kull grupp u tat-tixrid tas-sub-gruppi;

— dettalji tas-sistemi tal-marki, inkluża l-kriterja għall-iskali tal-marki dwar kull kejl fl-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati;

▼B

— dettalji dwar it-testijiet funzjonali għar-reattività sensitorja lejn l-istimuli ta' modalitajiet differenti (eż. awditorji, viżwali u proprjoċettivi); għall-assessjar tal-forza tal-qabda tad-driegħ jew tas-sieq; għall-assessjar ta' l-attività motorili (inklużi dettalji ta' apparat awtomatiku sabiex jiżvela l-attività); u l-proċeduri l-oħrajn kif użati;

— dettalji ta' l-eżaminazzjonijiet optalmoloġiċi u, jekk xieraq, l-eżaminazzjonijiet ħematoloġiċi u t-testijiet kliniċi tal-biokemistrija bil-valuri relavanti tal-bidu;

— dettalji għall-proċeduri newroimġieba, newropatoloġija, newrokimika jew elettrofiżjoloġiċi speċifiċi.

Riżultati:

— il-piż tal-ġisem/tibdiliet fil-piż tal-ġisem, inklużi l-piż tal-ġisem mal-qatla;

— il-konsum ta' l-ikel u l-konsum ta' l-ilma, kif xieraq;

— dettalji tar-reazzjoni tossika bis-sess u l-livell tad-doża, inklużi sinjali ta' tossiċità jew mortalità;

— in-natura, is-severità u t-tul ta' żmien (il-waqt ta' meta jiskoppja u l-korsa sussegwenti) ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (sew jekk riversibbli u anki jekk le);

— deskrizzjoni dettaljata tar-riżultati kollha tat-test funzjonali;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha, newroimġieba, newropatoloġikali, u newrokimiċi jew elettrofiżjoloġiċi, jekk disponibbli;

— id-dettalji ta' l-assorbazzjoni u l-metaboliżmu, (jekk disponibbli);

— trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq.

Diskussjoni tar-riżultati:

— informazzjoni dwar ir-reazzjoni mad-doża;

— relazzjoni ma xi effetti tossiċi oħrajn lejn konklużjoni dwar il-potenzal newrotossiku tal-kimika tat-test;

— il-livell ta' l-ebda effett ħazin ma jkun osservat.

Kunklużjonijiet:

— stqarrija speċifika dwar il-globalità newrotossika tal-kimika tat-test hija nkorraġġita.

4. **REFERENZI**

(1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/-London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabella 1

Numru minimu ta' annimali meħtieġa għal kull grupp meta l-istudju newrotossiku ikun imwettaq separatament jew flimkien ma studji oħrajn

	STUDJU NEWROTOSSIKU IMWETTAQ BĦALA:			
	Studju separate	Studju flimkien mal-istudju ta' 28 jum	Studju flimkien mal-istudju ta 90 jum	Studju flimkien mal-istudju dwar it-tossiċità kronika
Numru totali ta' l-annimali kull grupp	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	15 maskili u 15 femminili	25 maskili u 25 femminili
Numru ta' annimali magħżula għal testijiet funzjonali, inklużi l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili
Numru ta' annimali magħżula għal kull tixrid *in situ* u n-newroħispatoloġija	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili
Numru ta' annimali magħżula għall-osservazzjonijiet ta' dożi tossiċi repetuti/subkroniċi/koron iċi, il-ħematoloġija, il-biokemistrija klinika, il-ħispatoloġija, eċċ., kif indikat fil-Linji ta' Gwida rispettivi.		5 maskili u 5 femminili	10 maskili u 10 femminili †	20 maskili † u 20 femminili †
Osservazzjoni supplementarja, kif xieraq	5 maskili u 5 femminili			

† tinkludi ħames annimali magħżula għall-ittestjar funzjonali u osservazzjonijiet kliniċi bħala parti mill-istudju tan-newrotossiċita

▼B

Tabella 2

Frekwenza ta' l-osservazzjonijiet kliniċi u tat-testijiet funzjonali

Tip ta' l-osservazzjoni		It-tul ta' l-istudju			
		Akut	28-jum	90-jum	Kroniku
L-annimali kollha	Kondizzjoni ġenerali tas-saħħa	Kull jum	Kull jum	Kull jum	Kull jum
	Mortalià/ morbidità	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum
Fl-annimali magħżula għall-osservazzjonijiet funzjonali	Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Fi żmien 8 siegħat mid-doża fl-estimi tal-ħin l-aktar effettiv — Fil-jum 7 u 14 ta' wara d-doża	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fil-ġimgħa minn hem mil-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba matul l-ewwel u t-tieni ġimgħa ta' l-espożizzjoni — Darba fix-xahar minn hemm il-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fit-tmiem ta' l-ewwel xahar ta' l-espożizzjoni — Darba kull tlett xhur, minn hemm il-quddiem
	Testijiet Funzjonali	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Fi żmien 8 siegħat mid-doża fl-estimi tal-ħin l-aktar effettiv — Fil-jum 7 u 14 ta' wara d-doża	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Matul ir-raba' ġimgha tat-trattament, kemm jista' jkun qrib possibbli lejn it-tmiem tal-perjodu ta' l-espożizzjoni	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba matul l-ewwel u t-tieni ġimgħa ta' l-espożizzjoni — Darba fix-xahar minn hemm il-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fit-tmiem ta' l-ewwel xahar ta' l-espożizzjoni — Darba kull tlett xhur, minn hemm il-quddiem

▼B

B.44. **L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VIVO***

1. **IL-METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 427 (2004).

1.1 DAĦLA

L-espożizzjoni għal ħafna kimiċi ssir l-aktar permezz tal-ġilda filwaqt li l-parti l-kbira ta' l-istudji tossikoloġi mwettqa fuq l-annimali tal-laboratorju jużaw ir-rotta orali ta' l-amministrazzjoni. L-istudju ta' l-assorbiment perkutanju *in vivo* stabbilit f'din il-linja gwida jipprovdi l-kollegament meħtieġ biex jiġi estrapolat mill-istudji orali meta jsiru l-valutazzjonijiet tas-sigurtà wara l-espożizzjoni dermali.

Sustanza trid bilfors taqsam għadd kbir ta' saffi ta' ċelloli tal-ġilda qabel ma tilħaq iċ-ċirkolazzjoni. Il-pass li jiddetermina r-rata għall-parti l-kbira tas-sustanzi huwa l-i*stratum corneum* li jikkonsisti f'ċelloli mejtin. Il-permeabbiltà mill-ġilda tiddependi kemm fuq il-lopofiliċità tal-kimika kif ukoll fuq il-ħxuna tas-saff barrani ta' l-epidermis, ukoll fuq fatturi bħall-piż molekulari u l-konċentrazzjoni tas-sustanza. B'mod ġenerali, il-ġilda tal-firien u tal-fniek hija aktar permeabbli minn dik tal-bnedmin, filwaqt li l-permeabilità tal-ġilda tal-fniek ta' l-indi u tax-xadini hija aktar simili għal dik ta' l-umani.

Il-metodi biex jitkejjel l-assorbiment perkutanju jistgħu jitqassmu f'żewġ kategoriji; *in vivo* u *in vitro*. Il-metodu *in vivo* huwa kapaċi li jipprovdi informazzjoni tajba, f'bosta speċi tal-laboratorju, dwar l-assorbiment mill-ġilda. Aktar reċenti, ġew żviluppati l-metodi *in vitro*. Dawn jużaw it-trasport minn ġilda ta' ħxuna sħiħa jew parzjali ta' l-annimali jew umana lejn kontenitur ta' l-ilma. Il-metodu *in vitro* huwa deskritt f'Metodu tat-Test separat (1). Huwa rrakkomandat li d-Dokument ta' Gwida ta' l-OECD għat-Twettiq ta' l-Istudji dwar l-Assorbiment mill-Ġilda (2) jiġi kkonsultat għall-għajnuna fl-għażla tal-metodu tal-aktar xieraq fis-sitwazzjoni, għaliex jipprovdi aktar dettalji dwar kemm huma xierqa l-metodi *in vivo* u *in vitro*.

Il-metodu *in vivo*, deskritt f'dan il-metodu, jippermetti d-determinazzjoni tal-penetrazzjoni tas-sustanza tat-test mill-ġilda għal ġewwa l-kompartiment sistemiku. It-teknika intużat b'mod mifrux għal ħafna snin (3)(4)(5)(6)(7). Għalkemm l-istudji *in vitro* dwar l-assorbiment perkutanju jistgħu jkunu xierqa f'ħafna każijiet, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn studju *in vivo* biss jista' jipprovdi d-data meħtieġa.

Il-vantaġġi tal-metodu *in vivo* huma li juża sistema li hija fiżjoloġikament u metabolikament intatta, juża speċi li hija komuni għal bosta studji dwar it-tossiċità u jista' jiġi mmodifikat għall-użu ma' speċi oħrajn. L-iżvantaġġ huma li jintużaw annimali ħajjin, il-bżonn ta' materjal li huwa radjotikkettjat biex jiġu ffaċilitati r-riżultati dipendibbli, u d-diffikultajiet fid-determinazzjoni tal-faži ta' l-assorbiment bikri u d-differenzi fil-permeabilità tal-ġilda ta' l-ispeċi preferita (firien) u tal-bniedem. Il-ġilda ta' l-annimali normalment hija aktar permeabbli u għalhekk tista' toħloq stima kbira wisq dwar l-assorbiment perkutanju tal-bniedem (6)(8)(9). Is-sustanzi kawstiċi/korrożivi m'għandhomx jiġu ttestjati fl-annimali ħajjin.

▼B

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Doża mhux assorbita: tirrappreżenta dik maħsula mill-wiċċ tal-ġilida wara l-espożizzjoni u kwalunkwe doża preżenti fuq il-kopertura mhux poruża, inkluża kwalunkwe doża murija li tiżvinta minn fuq il-ġilda matul l-espożizzjoni.

Doża assorbita (*in vivo*): tinkludi dik preżenti fl-urina, fil-ħasil tal-gaggi, fil-feċi, fl-arja skaduta (jekk tiġi mkejla), fid-demm, fiċ-ċelloli (jekk jinġabru) u fil-karkass li jifdal, wara t-tneħħija tal-ġilda tas-sit ta' l-applikazzjoni.

Doża li tista' tiġi assorbita: tirrappreżenta d-doża preżenti fuq jew ġewwa l-ġilda wara l-ħasil.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test, preferibbilment radjotikkettjata, hija applikata fuq il-ġilda mqaxxra ta' annimali f'livell wieħed jew aktar ta' doża xierqa fil-forma ta' preparazzjoni fl-użu rappreżentattiva. Il-preparazzjoni tat-test hija permessa li tibqa' fil-kuntatt mal-ġilda għal perjodu ta' żmien fiss taħt kopertura xierqa (mhux poruża, semi-poruża, jew poruża) biex tiġi mrażżna l-inġestjoni tal-preparazzjoni tat-test. Fl-aħħar tal-ħin ta' l-espożizzjoni l-kopertura titneħħa u l-ġilda titnaddaf b'aġent xieraq tat-tindif, il-kopertura u l-materjali tat-tindif jinżammu għall-analiżi u tiġi provduta kopertura oħra. L-annimali jinżammu qabel, matul u wara l-perjodu ta' l-espożizzjoni f'gaġġi tal-metaboliżmu individwali, u l-ħmieġ u l-arja minfuħa 'l barra f'dawn il-perjodi jinġabru għall-analiżi. Il-ġbir ta' l-arja minfuħa 'l barra jista' jitħalla barra meta hemm biżżejjed informazzjoni li ftit jew xejn metabolit radjoattiv ma jiġi ffurmat. Normalment kull studju jinvolvi bosta gruppi ta' annimali li se jiġu esposti għall-preparazzjoni tat-test. Grupp wieħed jinqatel fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni. Gruppi oħrajn jinqatlu f'intervalli ta' ħin skedati wara dan (2). Fl-aħħar tal-ħin tat-teħid tal-kampjuni l-annimali li jifdal jinqatlu, jinġabar id-demm għall-analiżi, jitneħħa s-sit ta' l-applikazjoni għall-analiżi u l-karkass huwa analiżżat għal materjal li ma ġiex ekskretat. Il-kampjuni huma mogħdija mill-esperiment b'mezzi xierqa u l-livell ta' l-assorbiment perkutanju jiġi stmat (6)(8)(9).

1.4 DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.4.1 **L-għażla ta' l-ispeċi ta' l-annimali**

Il-far huwa l-ispeċi użata l-aktar spiss, iżda fergħat u speċi mingħajr suf li għandhom rati ta' l-assorbiment tal-ġilda aktar simili għal dawk tal-bnedmin, jistgħu jintużaw ukoll (3)(6)(7)(8)(9). Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ u b'saħħithom ta' sess uniku (is-sess normali huwa maskili) ta' fergħat użati ħafna fil-laboratorji. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni tal-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi ± 20 % tal-piż medju. Bħala eżempju, il-firien maskili ta' 200 g – 250 g huma xierqa, b'mod partikolari fl-ogħla nofs ta' din il-firxa.

▼B

1.4.2 **L-għadd u s-sess ta' l-annimali**

Għandu jintuża għal kull preparazzjoni tat-test u għal kull ħin ta' tmiem skedat, grupp ta' mhux inqas minn erba' annimali ta' sess uniku. Kull grupp ta' annimali jinqatel wara intervalli ta' żmien differenti, per eżempju fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni (tipikament 6 sigħat jew 24 siegħa) u fuq okkorrenzi sussegwenti (eż. 48 u 72 siegħa). Jekk hemm data disponibbli li juru differenzi sustanzjali fit-tossiċità dermali bejn il-maskili u l-femminili, għandu jintgħażel is-sess l-aktar sensittiv. Jekk ma hemmx data minn din, jista' jintuża kwalunkwe sess.

1.4.3 **Il-kundizzjonijiet taż-żamma u l-għalf**

It-temperatura fil-kamra ta' l-esperimenti ta' l-annimali għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun għall-inqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra, wieħed għandu jimmira lejn 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju u għandhom ikunu liberament disponibbli flimken ma' provvista mingħajr limitu ta' ilma għax-xorb. Matul l-istudju, u preferibbilment ukoll matul l-akklimatizzazzjoni, l-annimali jinżammu individwalment f'gaġeġ tal-metaboliżmu. Ladarba t-twaqqigħ ta' l-ikel u ta' l-ilma jista' jikkompromettu r-riżultati, il-probabbiltà ta' dawn l-okkorrenzi għandha tiġi minimizzata.

1.4.4 **Il-preparazzjoni ta' l-annimali**

L-annimali huma mmarkati biex tkun possibbli l-identifikazzjoni individwali u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għall-inqas għal ħamest ijiet qabel ma jinbeda l-istudju biex tkun possibbli l-akklimatizzazzjoni għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Wara l-perjodu ta' l-akklimatizzazzjoni, u madwar 24 siegħa qabel ma tingħata d-doża, kull animal ikollu parti ta' ġilda fir-reġjun ta' l-ispallejn u d-dar imqaxxra. Il-karatteristiċi ta' permeazzjoni ta' ġilda danneġġjata huma differenti mill-ġilda intatta u għandu jkun hemm attenzjoni li l-ġilda ma tinbaraxx. Wara t-tqaxxir u madwar 24 siegħa qabel ma tiġi applikata s-sustanza tat-test, (ara t-tqsima 1.4.7) il-wiċċ tal-ġilda għandu jintmesaħ bl-aċeton biex jitneħħa s-sebum. Mhijiex rakkomandata ħasla addizzjonali bis-sapun u bl-ilma għaliex ir-residwu tas-sapun jista' jippromwovi l-assorbument tas-sustanza tat-test. Iż-żona għandha tkun kbira biżżejjed biex tippermetti kalkolu dipendibbli ta' l-ammont tal-kimika tat-test asssorbit, preferibbilment għall-inqas 10 $ċm^2$. Din iż-żona hija prattikabbli bil-firien ta' piż tal-ġisem ta' 200-250 g. Wara l-preparazzjoni, l-annimali jiġu ritornati għal-gaġeġ tal-metaboliżmu.

1.4.5 **Is-sustanza tat-test**

Is-sustanza tat-test hija l-entità li l-karatteristiċi tal-permeazzjoni tagħha għandhom jiġu studjati. Idealment, is-sustanza tat-test għandha tiġi radjotikkettjata.

1.4.6 **Il-preparazzjoni tat-test**

Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test (eż. materjal mhux imħallat, imħallat jew ifformulat li fih il-kimika tat-test li hija applikata għall-ġilda(għandha tkun l-istess (jew surrogat realistiku) bħal dik li għalihom jistgħu jkunu esposti l-umani jew speċi oħrajn potenzjali mmirati. Kwalunkwe varjazzjoni mill-preparazzjoni "fl-użu" għandha tkun iġġustifikata. Fejn meħtieġ, is-sustanza tat-test hija maħlula jew sospiża f'kontenitur xieraq. Għal kontenituri minbarra l-ilma, il-karatteristiċi ta' l-assorbiment u l-interazzjoni potenzjali mas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufa.

▼B

1.4.7 **L-applikazzjoni tal-ġilda**

Sit ta' applikazzjoni ta' arja tal-wiċċ speċifika hija ddefinita fuq wiċċ il-ġilda. Ammont magħruf tal-preparazzjoni tat-test huwa mbagħad applikat b'mod uniformi fuq is-sit. Dan l-ammont għandu normalment jimita l-espożizzjoni potenzjali umana, tipikament 1-5 mg/ċm^2 għal solidu jew sa 10 µl/ċm^2 għal-likwidi. Kwantitajiet oħrajn għandhom ikunu ġġustifikati bil-kundizzjonijiet ta' l-użu mistenni, l-għanijiet ta' l-istudju jew il-karatteristiċi fiżiċi tal-preparazzjoni tat-test. Wara l-applikazzjoni, is-sit ittrattat għandu jiġi protett milli jintmess. Eżempju ta' tagħmir tipiku jintwera fil-Figura 1. Normalment, is-sit ta' l-applikazzjoni jiġi protett b'kopertura mhux poruża (eż. għata tal-garża tan-nylon permeabbli). Iżda, għal applikazzonijiet infiniti, is-sit ta' l-applikazzjoni għandu jiġi okkluż. Fil-każ li l-evaporazzjoni ta' sustanzi tat-test semi-volatili jnaqqas ir-rata ta' l-irkupru tas-sustanza tat-test sa livell mhux aċċettabbli (ara wkoll it-taqsima 1.4.1.0, l-ewwel paragrafu), huwa neċessarju li s-sustanza li żvintat tiġi evaporata f'filtru tal-faħam li jkopri t-tagħmir ta' l-applikazzjoni (ara l-Figura 1). Huwa importanti li t-tagħmir ma jagħmilx ħsara lill-ġilda, u lanqas ma jassorbi jew jirreaġixxi mal-preparazzjoni tat-test. L-annimali huma ritornati fil-gaġeġ tal-metaboliżmu individwali sabiex jinġabar il-ħmieġ tagħhom.

1.4.8 **Kemm iddum l-espożizzjoni u t-teħid tal-kampjuni**

Id-dewmien ta' l-espożizzjoni huwa l-intervall bejn l-applikazzjoni u t-tneħħija ta' preparazzjoni bil-ħasil tal-ġilda. Għandu jintuża perjodu rilevanti ta' l-espożizzjoni (tipikament 6 sigħat jew 24 siegħa) fuq bażi tad-dewmien ta' l-espożizzjoni mistennija umana. Wara l-perjodu ta' l-espożizzjoni, l-annimali jinżammu fil-gaġeġ tal-metaboliżmu sat-terminazzjoni kif ippjanat. L-annimali għandhom jiġu osservati għal sinjali ta' tossiċità/reazzjonijiet mhux normali f'intervalli regolari għal kemm idum l-istudju kollu. Flaħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, il-ġilda ttrattata għandha tiġi osservata għal sinjali viżibbli ta' irritazzjoni.

Il-gaġeġ tal-metaboliżmu għandhom jippermettu l-ġbir separat ta' l-urina u l-feċi matul l-istudju kollu. Għandhom jippermettu l-ġbir ta' diossidu tal-karbonju ^{14}C u komposti volatili ta' karbonju ^{14}C, li għandhom jiġu analizzati meta prodotti f'kwantitajiet kbar (> 5 %). L-urina, il-feċi u l-fluwidi intrappolati (eż. diossidu tal-karbonju ^{14}C u komposti volatili ta' ^{14}C) għandhom jinġabru individwalment minn kull gripp fil-ħin tat-teħid tal-kampjuni. Jekk hemm biżżejjed informazzjoni li ftit metabolit radojattiv li jiżvinta, jew xejn, ma jiġi ffurmat, jistgħu jintużaw gaġeġ miftuħin.

Matul il-perjodu ta' l-espożizzjoni, jinġabru l-excreta, sa 24 siegħa wara l-ewwel kuntatt tal-ġilda u mbagħad kuljum sa l-aħħar ta' l-esperiment. Filwaqt li normalment ikunu biżżejjed tliet intervalli tal-ġbir ta' l-excreta, l-għan ippjanat tal-preparazzjoni tat-test jew id-data kinetika eżistenti jistgħu jissuġġerixxu punti ta' żmien addizzjonali għall-istudju.

Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni it-tagħmir protettiv jitneħħa minn kull annimal u jitneħħa minn kull annimal u jinżamm separat għall-analiżi. Jekk il-ġilda ttrattata ta' l-annimali kollha għandha tinħasel għall-inqas 3 darbiet bl-aġent tat-tindif bl-użu ta' tajjar xieraq. Għandu jkun hemm attenzjoni biex jiġi evitat il-kontaminazzjoni ta' partijiet oħrajn tal-ġisem. L-aġent tat-tindif għandu jirrappreżenta l-prattika normali ta' l-iġjene, eż. taħlita tas-sapun bl-ilma. Fl-aħħar, il-ġilda għandha tiġi xxuttata. It-tajjar kollu u l-ħasil kollu għandhom jinżammu għall-analiżi. Għandha tiġi provduta kopertura friska biex is-sit ittrattat ta' dawk l-annimali li jiffurmaw il-gruppi tal-punti ta' ħin ta' wara jiġi protett, qabel ma jittieħdu lura fil-gaġeġ individwali.

▼B

1.4.9 **Il-proċeduri terminali**

Għal kull grupp, l-annimali individwali għandhom jinqatlu fil-ħin ippjanat u d-demm jinġabar għall-analiżi. It-tagħmir jew kopertura protettivi għandhom jitneħħew għall-analiżi. Il-ġilda mis-sit ta' l-applikazzjoni u minn żona simili ta' ġilda mhux iddożata u mqaxxra għandhom jitneħħew minn kull annimali għal analiżi separata. Is-sit ta' l-applikazzjoni jista' jkun frazzjonat biex jiġi sseparat l-i*stratum corneum* mill-epidermis ta' taħt biex tingħata aktar informazzjoni dwar id-dispożizzjoni tal-kimika tat-test. Id-determinazzjoni ta' din id-dispożizzjoni wara l-mogħdija ta' żmien ta' l-espożizzjoni għandha tipprovdi xi indikazzjoni tad-destin ta' kwalunkwe kimika tat-test fl-i*stratum corneum*. Biex tkun faċli l-frazzjonazzjoni tal-ġilda (wara l-aħħar ħasla tal-ġilda u l-qtil ta' l-annimal) kull kopertura protettiva titneħħa. Il-ġilda tas-sit ta' l-applikazzjoni, biċ-ċirku anulari tal-ġilda madwarha, tinqata' minn mal-far u tiġi mwaħħla b'labra fuq biċċa njama. Strixxa ta' tejp tiġi mwaħħla mal-wiċċ tal-ġilda bl-użu ta' pressjoni bil-mod u t-tejp jitneħħa flimkien ma' parti mill-i*stratum corneum*. Jiġu applikati strixxi ta' tejp oħrajn sakemm it-tejp ma jibqax jeħel mal-wiċċ tal-ġilda, meta l-i*stratum corneum* kollu jkun tneħħa. Għal kull animal, l-istrixxi kollha tat-tejp jistgħu jiġu kkombinati f'kontenitur wieħed li mbagħad jiżdied miegħu diġestant tat-tessut biex jissolubilizza l-i*stratum corneum*. Jistgħu jitneħħew tessuti potenzjalment immirati għal kejl separat qabel ma jiġi analiżżat il-karkass residwali għad-doża assorbita tal-karkass. Il-karkassi ta' l-annimali individwali għandhom jinżammu għall-analiżi. Normalment l-organi mmirati jitneħħew għall-analiżi separata (jekk indikat minn studji oħrajn). L-urina preżenti fil-marrara fil-qtil ippjanat għandha tiżdied mal-ġabra ta' l-urina ta' qabel. Wara li jinġabar il-ħmieġ mil-gaġeġ tal-metaboliżmu wara l-qtil fil-ħin ippjanat, il-gaġeġ u l-bibien tagħhom għandhom jinħaslu b'solvent xieraq. Għandu wkoll jiġi analizzat tagħmir ieħor potenzjalment ikkontaminat.

1.4.10 **Analiżi**

Fl-istudji kollha għandu jinkiseb l-irkupru xieraq (jiġifieri medja ta' 100 ± 10 % tar-radjoattività). L-irkupru barra minn din il-firxa għandu jiġi ġġustifikat. L-ammont tad-doża somministrata f'kull kampjun għandu jiġi analizzat fi proċeduri validati kif xieraq.

Il-kunsiderazzjonijiet statistiċi għandhom jinkludu miżura ta' varjanza għar-replikati għal kull applikazzjoni.

2. **DATA**

Dan il-kejl għandu jsir għal kull annimal, f'kull ħin tat-teħid tal-kampjuni għall-kimika tat-test u/jew metabolite. Minbarra d-data individwali, id-data miġbura skond il-ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni għandha tiġi rrapportata bħala medja.

— kwantità assoċjata ma' l-applikazzjonijiet protettivi;

— kwantità li tista' tinqala' minn mal-ġilda;

— kwantità fi/fuq il-ġilda li ma tista'x tinħasel minn mal-ġilda;

▼B

— kwantità fid-demm li ttieħed bħala kampjun;

— kwantità fl-excreta u fl-arja skaduta (jekk xieraq);

— kwantità li jifdal fil-karkass u kwalunkwe organi mneħħi għall-analiżi separata.

Il-kwantità tas-sustanza tat-test u/jew metabolit fil-ħmieġ, fl-arja skaduta, fid-demm u fil-karkass tippermetti d-determinazzjoni ta' l-ammont totali assorbit f'kull punt ta' ħin. Jista' jinkiseb ukoll kalkolu ta' l-ammont ta' kimika tat-test assorbit għal kull ċm^2 ta' ġilda esposta għas-sustanza tat-test fil-perjodu ta' l-espożizzjoni.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1 IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport għandu jinkludi r-rekwiżiti stipulati fil-protokoll, inkluża ġustifikazzjoni tas-sistema tat-test użata u għandu tinkludi dawn li ġejjin:

Is-Sustanza tat-Test:

— id-data ta' l-identifikazzjoni [eż. CAS numru, jekk disponibbli; għajn; safa (safa radjokimika); impuritajiet magħrufin; numru tal-lott]

— in-natura fiżika, il-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, solubilità, stabilità, piż molekulari u P_{ow}).

Il-preparazzjoni tat-test:

— formulazzjoni u ġustifikazzjoni ta' l-użu;

— dettalji tal-preparazzjoni tat-test, l-ammont applikat, il-konċentrazzjoni miksuba, il-mezz, l-istabilità u l-omoġeneità.

L-annimal tat-test:

— speċi/fergħa użata;

— numbru, età u sess ta' l-annimali;

— għajn ta' l-annimali, kundizzjonijiet taż-żamma, dieti, eċċ.;

— piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— dettalji ta' l-amministrazzjoni tal-preparazzjoni tat-test (sit ta' l-applikazzjoni, metodi ta' l-esperiment, porożità/nuqqas ta' porożità, volum, estrazzjoni, skoperta);

— dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità;

— data tabulata dwa l-assorbiment (espresso bħala rata, ammont jew persentaġġ);

▼B

— irkupri totali ta' l-esperiment;

— interpretazzjoni tar-riżultati, tqabbil ma' data disponibbli jew assorbiment perkutanju tal-kompost tat-test.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

1. Metodu tat-Test B.45. L-Assorbiment tal-Ġilda: Metodu *In vitro*

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. J. *Am. Coll. Toxicol*. 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

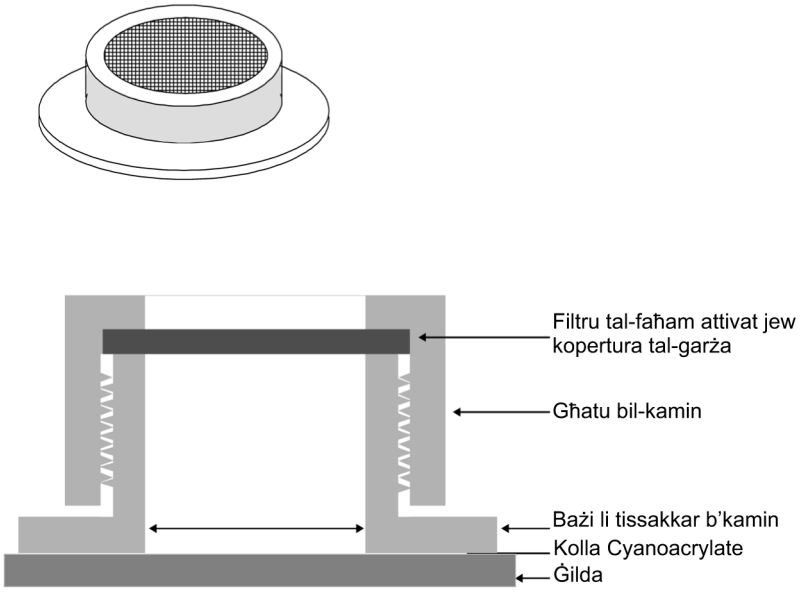
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, 399-404.

▼B

Figura 1

Eżempju ta' Diżinn ta' Tagħmir Tipiku użat biex jiġi Definit u Protett Sit ta' l-Applikazzjoni Dermali matul Studji *in vivo* ta' l-Assorbiment Perkutanju



▼B

B.45. **L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VITRO***

1. **IL-METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 428 (2004).

1.1 DAĦLA

Dan il-Metodu ġie ddiżinjat biex jipprovdi informazzjoni dwar l-assorbiment ta' sustanza tat-test applikata għall-ġilda maqtugħa barra. Jista' jiġi kkombinat mal-Metodu għall-Assorbiment tal-Ġilda: Il-Metodu *In vivo* (1), jew isir separatament. Huwa rrakkomandat li d-Dokument ta' Gwida ta' l-OECD għat-Twettiq ta' l-Istudji dwar l-Assorbiment mill-Ġilda (2) jiġi kkonsultat għall-għajnuna fid-disinn ta' l-istudji bbażati fuq dan il-Metodu. Id-Dokument ta' Gwida ġie ppreparat biex jiffaċilita l-għażla ta' proċeduri *in vitro* xierqa għall-użu f'ċirkostanzi speċifiċi, biex tiġi żgurata d-dependibbiltà tar-riżultati miksuba b'dan il-metodu.

Il-metodi biex jitkejjel l-assorbiment perkutanju jistgħu jitqassmu f'żewġ kategoriji; *in vivo* u *in vitro*. Il-metodi *in vivo* dwar l-assorbiment tal-ġilda huma stabbiliti sew u jipprovdu informazzjoni farmakokinetika f'firxa ta' speċje ta' l-annimali. Il-metodu *in vivo* huwa deskritt separatament f'Metodu tat-Test ieħor (1). Il-metodi *in vitro* ukoll intużaw għal bosta snin biex jitkejjel l-assorbiment tal-ġilda. Għalkemm l-istudji tal-validazzjoni formali tal-metodi *in vitro* koperti b'dan il-Metodu tat-Test ma sarux, l-esperti ta' l-OECD qablu fl-1999 li kien hemm biżżejjed data evalwata biex issostni l-metodu *in vitro* (3). Aktar dettalji li jissostanzjaw dan is-sostenn, inkluż għadd sinjifikanti ta' paraguni diretti tal-metodi *in vitro* u *in vivo,* jingħataw mad-Dokument ta' Gwida (2). Hemm għadd ta' monografi li jeżaminaw dan is-suġġett u jagħtu sfond dettaljat dwar l-użu ta' metodu *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Il-metodi *in vitro* jkejlu d-diffużjoni tal-kimika fi u minn ġo l-ġilda lejn kontenitur tal-fluwidu u jistgħu jużaw ġilda mhux vijabbli biex ikejlu d-diffużjoni biss, jew ġilda attiva, metabolikament attiva, biex fl-istess ħin ikejlu d-diffużjoni u l-metaboliżmu tal-ġilda. Dawn il-metodi nstabu partikolarment utli bħala skrin għat-tqabbil tat-twassil tal-kimika fi u minn ġo l-ġilda minn formolazzjonijiet differenti u jistgħu wkoll jipprovdu mudelli utli għall-istima ta' l-assorbiment perkutanju mill-ġilda.

Il-metodu *in vitro* jista' ma jgħoddx għas-sitazzjonijiet kollha jew għall-klassijiet kollha tal-kimiċi. Jista' jkun possibbli li jintuża l-metodu tat-test *in vitro* għall-evalwazzjoni kwalitattiva inizzjali tal-penetrazzjoni tal-ġilda. F'xi każijiet jista' jkun meħtieġ li mbagħad ikun hemm id-data *in vivo*. Id-dokument ta' gwida (2) għandu jiġi kkonsultat għal aktar elaborazzjoni ta' sitwazzjonijiet fejn ikun xieraq il-metodu *in vitro*. Informazzjoni addizzjonali dettaljata biex tiġi sostnuta d-deċiżjoni tingħata f'(3).

Dan il-metodu jippreżenta l-prinċipji ġenerali biex jitkejjel l-assorbiment dermali u t-twassil tas-sustanza tat-test bl-użu tal-ġilda maqtugħa barra. Tista' tintuża l-ġilda minn bosta speċje mammiferi, inklużi l-bnedmin. Il-karatteristiċi tal-permeabilità tal-ġilda jinżammu wara li tinqata' minn mal-ġilda għaljiex l-ostakolu prinċipali tad-diffużjoni huwa l-i*stratum corneum* mhux vijabbli; it-trasport attiv tal-kimika mill-ġilda ma ġiex identifikat. Il-ġilda ntweriet li għandha l-kapaċità li timmetabolizza xi kimika matul l-assorbiment perkutanju (6), iżda dan il-proċess ma jillimitax ir-rata f'termini ta' doża attwalment assorbita, għalkemm jista' jaffettwa n-natura ta' materjal li daħlet fis-sistema tad-demm.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Doża mhux assorbita: tirrappreżenta dik maħsula mill-wiċċ tal-ġilida wara l-espożizzjoni u kwalunkwe doża preżenti fuq il-kopertura mhux poruża, inkluża kwalunkwe doża murija li tiżvinta minn fuq il-ġilda matul l-espożizzjoni.

Doża assorbita (*in vitro*): massa tas-sustanza tat-test li tilħaq il-fluwidu reċettur jew iċ-ċirkolazzjoni sistemika f'ħin speċifikat.

Doża li tista' tiġi assorbita (*in vitro*): tirrappreżenta d-doża preżenti fuq jew ġewwa l-ġilda wara l-ħasil.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test, li tista' tkun radjotikkettjata, hija applikata fuq il-wiċċ ta' kampjun tal-ġilda li jissepara żewġ kompartimenti ta' ċellola tad-diffużjoni. Il-kimika tibqa' fuq il-ġilda għal żmien speċifikat taħt kundizzjonijiet speċifikati, qabel ma titneħħa bi proċedura xierqa tat-tindif. Jittieħed kampjun tal-fluwidu reċettorju f'punti matul l-esperiment u jiġi analizzat għall-kimika tat-test u/jew metaboliti.

Meta jintużaw sistemi metabolikament attivi, il-metaboliti tal-kimika tat-test jistgħu jiġu analizzati b'metodi xierqa. Fl-aħħar ta' l-esperiment, id-distribuzzjoni tal-kimika tat-test u l-metaboliti tagħha jiġu kkwantifikat, meta jkun xieraq.

Bl-użu ta' kundizzjonijiet xierqa, li huma deskritti f'dan il-metodu u fid-dokument ta' gwida (2), l-assorbiment ta' sustanza tat-test matul terminu definit jitkejjel bl-analiżi tal-fluwidu reċettorju u tal-ġilda ttrattata. Is-sustanza tat-test li jifdal fil-ġilda għandha titqies bħala assorbita mill-valuri tal-fluwidu reċettorji waħdu. L-analiżi tal-komponenti oħrajn (materjal maħsul minn mal-ġilda u li jifdal fis-saffi tal-ġilda) tippermetti evalwazzjoni ulterjuri tad-data, inkluża d-dispożizzjoni totali tas-sustanza tat-test u l-perċentwal ta' l-irkupru.

Biex jintwera l-operat u d-dipendibbiltà tas-sistema tat-test fil-laboratorju tal-ħidma, ir-riżultati għall-kimiċi rilevanti ta' referenza għandhom ikunu disponibbli u bi qbil mal-letteratura pubblikata għall-metodu użat. Dan ir-rekwiżit jista' jintlaħaq billi tiġi ttestjata sustanza xierqa ta' riferenza (preferibbilment ta' lipofiliċità qrib is-sustanza tat-test) b'mod konkurrenti mas-sustanza tat-test jew bil-proviżon ta' data storika xierqa għal għadd ta' sustanzi ta' riferenza ta' lipofiliċità differenti (eż. il-kaffeina, l-aċidu benżoiku, u t-testosterone).

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **Iċ-ċellola tad-diffużjoni**

Ċellola tad-diffużjoni tikkonsisti f'kompartiment donatur u kompartiment reċettorju li bejniethom titqiegħed il-ġilda (eżempju ta' diżinn tipiku huwa provdut fil-Figura 1). Iċ-ċellola għandha tipprovdi siġill tajjeb madwar il-ġilda, tippermetti t-teħid faċli tal-kampjuni u taħlit tajjeb tat-taħlita reċettorja f'kuntatt mal-parti ta' taħt tal-ġilda, u l-kontroll tajjeb tat-temperatura taċ-ċellola u l-kontenut tagħha. Iċ-ċelloli statiċi u li jippermettu d-diffużjoni bit-tnixxija huma t-tnejn aċċettabbli. Normalment, il-kompartimenti donaturi jitħallew mhux poruži matul l-espożizzjoni għal doża tal-preparazzjoni tat-test. Madankollu, għal applikazzjonijiet infiniti u għal xi xenarji għal dożi finite, il-kompartimenti donaturi jistgħu jkunu poruži.

▼B

1.4.2. **Il-fluwidu reċettorju**

L-użu ta' fluwidu reċettorju fiżjoloġikament konduċiv huwa preferit għalkemm jistgħu jintużaw kemm-il darba huma ġġustifikati. Il-kompożizzjoni preċiża tal-fluwidu reċettorju għandha tkun provduta. Is-solubilità xierqa tal-kimika tat-test fil-fluwidu reċettorju għandha tintwera sabiex ma taġixxix bħala ostakolu għall-assorbiment. Barra minn hekk, il-fluwidu reċettorju m'għandux jaffettwa l-integrità tal-preparazzjoni tal-ġilda. F'sistema tat-tnixxija, ir-rata tat-tnixxija m'għandhiex tostakola d-diffużjoni ta' sostanza tat-test fil-fluwidu reċettorju. F'sistema ta' ċelloli statiċi, il-fluwidu għandu jiġi mħawwad kontinwament u jittieħdu l-kampjuni regolarment. Jekk il-metaboliżmu qed jiġi studjat, il-fluwidu reċettorju għandu jsostni l-vijabilità tal-ġilda tul l-esperiment kollu.

1.4.3 **Il-preparazzjonijiet tal-ġilda**

Tista' tintuża ġilda minn għejun umani jew ta' l-annimali. Huwa rikonoxxut li l-użu tal-ġilda umana huwa soġġett għal kunsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali. Għalkemm hija preferuta ġilda vijabbli, tista' tinuża wkoll ġilda mhux vijabbli kemm-il darba l-integrità tal-ġilda tista' tintwera. Huma aċċettabbli membrani epidermali (separati enżimikament, bis-sħana jew kimikament) jew ġilda ta' ħxuna maqsuma (tipikament ħoxna daqs 200-400 μm) ippreparati b'dermatome. Tista' tintuża ġilda ta' ħxuna sħiħa iżda l-ħxuna eċċessiva *(c*a. > 1 mm) għandha tiġi evitata kemm-il darba mhijiex speċifikament meħtieġa għad-determinazzjoni tal-kimika tat-test fis-saffi tal-ġilda. L-għażla ta' l-ispeċje, tas-sit anatomiku u tat-teknika preparattiva għandhom ikunu ġġustifikati. Id-data aċċettabbli minn minimu ta' erba' replikati għal kull preparazzjoni tat-test hija meħtieġa.

1.4.4 **L-integrità tal-Preparazzjoni tal-Ġilda**

Huwa essenzjali li l-ġilda hija ppreparata sew. L-immaniġġjar mhux xieraq jista' jirriżulta f'dannu lill-i*stratum corneu*m, u għalhekk l-integrità tal-ġilda ppreparata għandha tiġi ċċekkjata. Meta jiġi investigat il-metaboliżmu tal-ġilda, il-ġilda maqtugħa barra friska għandha tintuża mill-aktar fis possibbli, u taħt kundizzjonijiet magħrufa li jsostnu l-attività metabolika. Bħala gwida ġenerali, il-ġilda maqtugħa barra friska għandha tintuża fi żmien 24 siegħa, iżda l-perjodu aċċettabbli tal-ħażna jista' jvarja skond is-sistema ta' l-enżimi involuti fil-metabolizzazzjoni u t-temperaturi tal-ħażna (13). Meta l-preparazzjonijiet tal-ġilda jkunu nħażnu qabel ma jintużaw, għandha tingħata prova biex turi li l-funzjoni ta' ostakolu nżammet.

1.4.5 **Is-sustanza tat-test**

Is-sustanza tat-test hija l-entità li l-karatteristiċi tal-permeazzjoni tagħha għandhom jiġu studjati. Idealment, is-sustanza tat-test għandha tiġi radjotikkettjata.

1.4.6 **Il-preparazzjoni tat-test**

Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test (eż. materjal mhux imħallat, imħallat jew ifformulat li fih il-kimika tat-test li hija applikata għall-ġilda għandha tkun l-istess (jew surrogat realistiku) bħal dik li għalihom jistgħu jkunu esposti l-umani jew speċje oħrajn potenzjali mmirati. Kwalunkwe varjazzjoni mill-preparazzjoni "fl-użu" għandha tkun iġġustifikata.

▼B

1.4.7 **Il-Konċentrazzjonijiet u l-Formulazzjonijiet tas-Sustanzi tat-Test**

Normalment tintuża aktar minn konċentrazzjoni waħda li hija mifruxa fuq l-ogħla espożizzjonijiet potenzjali umani. Bl-istess mod, għandu jitqies l-ittestjar ta' firxa ta' formulazzjonijiet tipiċi.

1.4.8 **L-applikazzjoni tal-ġilda**

Taħt kundizzjonijiet normali ta' espożizzjoni umana għall-kimika, normalment ikun hemm dożi finiti. Għalhekk, għandha titntuża applikazzjoni li timita l-espożizzjoni umana, normalment 1-5 mg/cm^2 ġilda għal solidu u sa 10 µl/cm2 għal-likwidi. Il-kwantità għandha tkun ġustifikata mill-kundizzjonijiet ta' l-użu mistenni, mill-għanijiet ta' l-istudju jew mill-karatteristiċi tal-preparazzjoni tat-test. Per eżempju, l-applikazzjonijiet għall-wiċċ tal-ġilda jistgħu jkunu infiniti, fejn huma applikati volumi kbar għal kull żona ta' unità.

1.4.9 **Temperatura**

Id-diffużjoni passiva tal-kimiċi (u għalhekk l-assorbiment tagħhom mill-ġilda) hija affettwata mit-temperatura. Il-kompartiment tad-diffużjoni u l-ġilda għandhom jinżammu f'temperatura kostanti qrib dik normali tal-ġilda ta' 32+/-1 °C. Diżinji differenti taċ-ċelloli jeħtieġu temperaturi differenti tal-banju ta' l-ilma jew tal-blokka msaħħna sabiex jiġi żgurat li r-reċettur/ġilda ikun/tkun fin-norma fiżjoloġika. L-umdità għandha preferibbilment tkun bejn it-30 u s-70 %.

1.4.10 **Kemm iddum l-espożizzjoni u t-teħid tal-kampjuni**

L-espożizzjoni tal-ġilda għall-preparazzjoni tat-test tista' tkun għal kemm idum l-esperiment jew għal termini iqsar (jiġifieri, biex tiġi imitata espożizzjoni umana ta' tip speċifiku). Il-ġilda għandha tinħasel mill-preparazzjoni tat-test żejda b'aġent tat-tindif rilevanti, u t-tlaħliħ jinġabar għall-analiżi. Il-proċedura tat-tneħħija tal-preparazzjoni tat-test tiddependi fuq il-kundizzjoni ta' l-użu mistenni, u għandha tiġi ġustifikata. Normalment huwa meħtieġ perjodu tat-teħid tal-kampjuni ta' 24 siegħa biex tkun possibbli l-karatterizzazzjoni xierqa tal-profil ta' l-assorbiment. Ladarba l-integrità tal-ġilda tista' tibda tiddeterjora wara 24 siegħa, il-ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni normalment m'għandhomx jeċċedu 24 siegħa. Għas-sustanzi tat-test li jippenetraw il-ġilda malajr, dan jista' ma jkunx meħtieġ, iżda, għas-sustanzi tat-test li jippenetraw bil-mod, jistgħu jkunu meħtieġa perjodi itwal. Il-frekwenza tat-teħid tal-kampjuni tal-fluwidu reċettorju għandha tippermetti lill-profil ta' l-assorbiment tas-sustanza tat-test jiġi ppreżentat grafikament.

1.4.11 **Il-proċeduri terminali**

Il-komponenti kollha tas-sistema tat-test għandhom jiġu analizzati u l-irkupru għandu jiġi determinat. Dan jikludi l-kompartiment donator, it-tlaħliħ tal-wiċċ tal-ġilda, il-preparazzjoni tal-ġilda u l-fluwidu/kompartiment reċettorju. F'xi każijiet, il-ġilda tista' tiġi frazzjonata fil-parti esposta tal-ġilda u l-parti tal-ġilda taħt il-flanġa tal-ġilda, u fl-i*stratum corneu*m, l-epidermis u l-frazzjonijiet tad-dermis, għall-analiżi separata.

1.4.12 **L-analiżi**

Fl-istudji kollha għandu jinkiseb l-irkupru xieraq (il-mira għandha tkun medja ta' 100+/-10 % tar-radjoattività u kwalunkwe devjazzjoni għandha tkun iġġustifikata). L-ammont tas-sustanza tat-test fil-fluwidu reċettorju, fil-preparazzjoni tal-ġilda, fil-ħasil tal-wiċċ tal-ġilda u fit-tlaħliħ ta' l-apparat għandu jiġi analizzat, bl-użu ta' teknika xierqa.

▼B

2. **ID-DATA**

L-analiżi tal-fluwidu reċettorju, id-distribuzzjoni tal-kimika tas-sustanza tat-test fis-sistema tat-test u l-profil ta' l-assorbiment mal-ħin, għandhom jiġu ppreżentati. Meta jintużaw kundizzjonijiet ta' l-espożizzjoni għal dożi finita, il-kwantità maħsula mill-ġilda, il-kwantità assoċjataa mal-ġilda (u f'saffi differenti tal-ġilda jekk analizzata) u l-ammont preżenti fil-fluwidu reċettorju (rata, u l-ammont jew perċentwal tad-doża applikata) għandhom jiġu kkal-kolati. L-assorbiment mill-ġilda jista' kultant jiġi espress bl-użu tad-data tal-fluwidu reċettorju biss. Madankollu meta s-sustanza tat-test tibqa' fil-ġilda fl-aħħar ta' l-istudju, jista' jkun meħtieġ li tiġi inkluża fl-ammont totali assorbit (ara l-paragafu 66 fir-referenza (3)). Meta jintużaw kundizzjonijiet ta' dożi infiniti ta' espożizzjoni id-data tista' tippermetti l-kalkolu ta' kostant tal-permeabilità (Kp). Taħt dawn il-kundizzjonijiet ta' l-aħħar, il-perċentwal assorbit mhuwiex rilevanti.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport għandu jinkludi r-rekwiżiti stipulati fil-protokoll, inkluża ġustifikazzjoni tas-sistema tat-test użata u għandu tinkludi dawn li ġejjin:

Is-Sustanza tat-Test:

— in-natura fiżika, il-karatteristiċi fiżikokimiċi (għall-inqas il-piż molekulari u log P_{ow}), safa (safa radjokimika);

— informazzjoni ta' l-identifikazzjoni (eż. lott numru);

— solubilità fi fluwidu reċettorju.

Il-preparazzjoni tat-test:

— formulazzjoni u ġustifikazzjoni ta'l-użu;

— omoġeneità.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— għejun u s-sit tal-ġilda, il-metodu tal-preparazzjoni, il-kundiz-zjonijiet tal-ħażna qabel l-użu, kwalunkwe trattament qabel (tindif, trattament antibjotiku, eċċ), kejl ta' l-integrità tal-ġilda, stat metaboliku, ġustifikazzjoni ta' l-użu;

— diżinn taċ-ċelloli, kompożizzjoni tal-fluwidu reċettorju, rata tat-tnixxija tal-fluwidu jew ħinijiet u proċeduri tat-teħid tal-kampjuni;

— dettalji ta' l-applikazzjoni f test tal-preparazzjoni tat-test u l-kwantifikazzjoni tad-doża applikata;

— kemm iddum l-espożizzjoni;

— dettalji tat-tneħħija tal-preparazzjonijiet mill-ġilda, eż. tlaħliħ tal-ġilda;

— dettalji ta' l-analiżi tal-ġilda u kwalunkwe teknika tal-frazzjo-nazzjoni użata biex tintwera d-distribuzzjoni tal-ġilda;

▼B

— proċeduri tal-ħasil taċ-ċelloli u tat-tagħmir;

— metodi ta' l-esperimenti, tekniċi ta' l-estrazzjoni, limiti ta' l-iskoperta u validazzjoni analitika tal-metodu.

Riżultati:

— irkupru totali ta' l-esperiment (Doża applikata ≡ Ħasil tal-ġilda + Ġilda + Fluwidu reċettur + Ħasil taċ-Ċelloli);

— tabulazzjoni ta' l-irkupru individwali taċ-ċelloli f'kull kompartiment;

— profil ta' l-assorbiment;

— data tabulata dwar l-assorbiment (espressa bħala rata, ammont jew perċentwal).

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

1. Metodu tat-Test B.44. L-Assorbiment tal-Ġilda: Metodu *In vivo*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2 000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussel.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et a*l. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

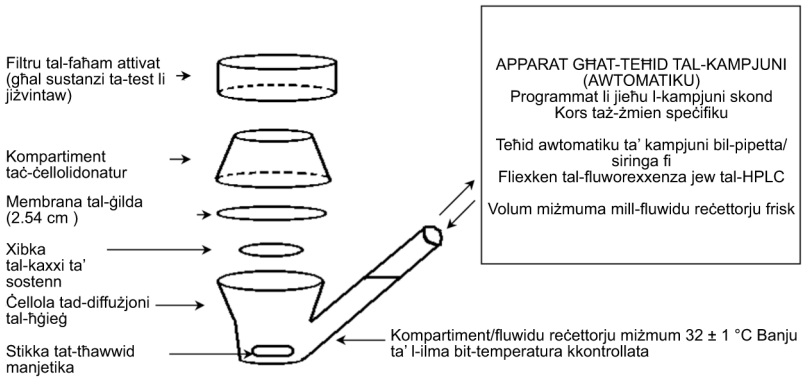
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Eżempju ta' Diżinn Tipiku ta' Ċellola tad-Diffużjoni Statika għall-Istudji *in vitro* ta' l-Assorbiment Perkutanju



▼M8

B.46. IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-*EPIDERMIS* UMAN RIKOSTITWIT

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 439 tal-OECD (2015). L-irritazzjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irriversibbli għall-ġilda wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal massimu ta' 4 siegħat [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU)](1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1]). Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi proċedura *in vitro* li tista' tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi kimiċi irritanti (sustanzi u taħlitiet) f'konformità mal-GHS tan-NU/mal-Kategorija 2 tas-CLP (2). Fir-reġjuni li ma jadottawx il-Kategorija 3 tal-GHS tan-NU (irritanti ħfief), dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża wkoll biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi mhux klassifikati. Għaldaqstant, skont il-qafas regolatorju u s-sistema ta' klassifikazzjoni użati, dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża biex tiġi determinata l-irritazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi jew bħala test sostitut awtonomu għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda *in vivo* jew bħala test sostitut parzjali fi ħdan strateġija ta' ttestjar (3).

2. Il-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda tipikament involviet l-użu ta' annimali tal-laboratorju [TM B.4, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD oriġinarjament adottata fl-1981, u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015] (4). Għall-ittestjar tal-korruživitá, ġew adottati tliet metodi ta' ttestjar *in vitro* validati bħala EU TM B.40 (ekwivalenti għat-TG 430 tal-OECD), it-TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) u t-TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) tal-OECD (5) (6) (7). Dokument ta' gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża *data* eżistenti tat-testijiet u mhux tat-testijiet għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (3).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-irritazzjoni tal-ġilda tal-punt ta' tmiem tas-saħħa umana. Hu bbażat fuq is-sistema ta' ttestjar *in vitro* tal-*epidermis* uman rikostitwit (RhE), li jimita mill-qrib il-proprjetajiet bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-partijiet superjuri tal-ġilda umana, jiġifieri l-*epidermis*. Is-sistema tat-test tal-RhE tuża keratinoċiti mhux trasformati derivati mill-bniedem bħala sors ta' ċelloli biex tirrikostitwixxi mudell epidermali b'istoloġija u b'ċitoarkitettura rappreżentattivi. Hemm Standards tal-Prestazzjoni (PS) disponibbli biex jiffaċilitaw il-validazzjoni u l-valutazzjoni ta' metodi ta' ttestjar tal-RhE simili u modifikati, f'konformità mal-prinċipji tad-dokument ta' gwida tal-OECD Nru 34 (8) (9). Il-linja gwida korrispondenti oriġinarjament ġiet adottata fl-2010, aġġornata fl-2013 biex tinkludi mudelli tal-RhE, u ġiet aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tintroduċi l-użu ta' proċedura alternattiva għall-kejl tal-vijabbiltà.

4. Tlestew studji ta' qabel il-validazzjoni, dwar l-ottimizzazzjoni u l-validazzjoni għal erba' mudelli tat-test *in vitro* disponibbli kummerċjalment (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) fuq il-bażi tas-sistema ta' ttestjar tal-RhE (sensittività 80 %, speċifiċità 70 %, u preċiżjoni 75 %). Dawn l-erba' mudelli tat-test huma inklużi

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

▼M8

f'din it-TM u huma elenkati fl-Appendiċi 2, li jipprovdi wkoll informazzjoni dwar it-tip ta' studju ta' validazzjoni użat għall-validazzjoni tal-metodi ta' ttestjar rispettivi. Kif innotat fl-Appendiċi 2, il-Metodu ta' Referenza Validat (VRM) intuża biex jiġu żviluppati l-metodu ta' ttestjar preżenti u l-Istandards tal-Prestazzjoni (8).

5. L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD tkun garantita biss għall-mudelli tat-test validati skont l-Istandards tal-Prestazzjoni (8), jekk dawn il-mudelli tat-test ikunu ġew rieżaminati u adottati mill-OECD. Il-mudelli tat-test inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar u t-TG korrispondenti tal-OECD jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-riżultati tat-testijiet mill-metodi ta' ttestjar *in vitro* għall-irritazzjoni tal-ġilda, filwaqt li jibbenefikaw mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data*.

6. Id-definizzjonijiet tat-termini użati f'dan id-dokument huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Limitazzjoni tal-metodu ta' ttestjar, kif muri mill-istudju ta' validazzjoni prospettiv sħiħ li jivvaluta u jikkaratterizza l-metodi ta' ttestjar tal-RhE (16), hi li dan ma jipermettix il-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi għall-Kategorija 3 tal-GHS tan-NU (irritanti ħfief) (1). B'hekk, il-qafas regolatorju fil-pajjiżi membri se jiddeċiedi kif se jintuża dan il-metodu ta' ttestjar. Għall-UE, il-Kategorija 3 ma ntużatx fis-CLP. Għal evalwazzjoni sħiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermali wieħed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (3). Hu rikonoxxut li l-użu ta' ġilda umana hu soġġett għal konsiderazzjonijiet u għal kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-irritazzjoni tal-ġilda tal-punt ta' tmiem tas-saħħa umana. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar il-korrużjoni tal-ġilda, ta' min jinnota t-TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) dwar il-korrużjoni tal-ġilda hu bbażat fuq l-istess sistema tat-test tal-RhE, għalkemm juża protokoll ieħor (6). Dan il-metodu ta' ttestjar hu bbażat fuq il-mudelli tal-RhE billi jintużaw keratinoċiti umani, li għaldaqstant jirrappreżentaw b'mod *in vitro* l-organu fil-mira tal-ispeċi ta' interess. Barra minn hekk, dan ikopri direttament il-pass inizjali tal-katina/mekkaniżmu infjammatorja/u tal-azzjoni (ħsara liċ-ċelloli u lit-tessut li tirriżulta fi trawma lokalizzata) li sseħħ/jseħħ waqt l-irritazzjoni *in vivo*. Ġiet ittestjata firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi fil-validazzjoni li hi l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar u l-bażi ta' *data* tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 58 sustanza kimika (16) (18) (23). Il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għas-solidi, għal-likwidi, għas-semisolidi u għax-xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu mitħuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda pretrattament ieħor tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx eżaminati fi studju ta' validazzjoni (29). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

9. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Madankollu, minħabba l-fatt li t-taħlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli

▼M8

biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-taħlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' taħlitiet (*eż.* skont strateġika kif proposta f'Eskes *et al.*, 2012 (30)), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' taħlitiet. Għandha tingħata attenzjoni speċjali f'każ li klassijiet speċifiċi ta' sustanzi kimiċi jew proprjetajiet fiżikokimiċi jinstab li ma jkunux applikabbli għall-metodu ta' ttestjar kurrenti.

10. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejlijiet tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet (ara l-paragrafi 28-34).

11. Sessjoni waħda ta' ttestjar magħmula minn tliet tessuti rreplikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew il-vijabbiltà perċentwali medja ugwali għal 50 ± 5 %, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, ifformata minn keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-epidermis uman, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermis* uman. Din tikkonsisti f'saff tal-qiegħ, saff spinuż u saff granulari organizzati, u *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellolari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analogu għal dawk li jinstabu *in vivo*.

13. Irritazzjoni tal-ġilda indotta b'sustanza kimika, murija primarjament b'eritema u edema, hi r-riżultat ta' kaskata ta' avvenimenti li jibdew bil-penetrazzjoni tas-sustanzi kimiċi permezz tal-*istratum corneum* fejn dawn jistgħu jagħmlu ħsara lis-saffi sottostanti tal-keratinoċiti u lil ċelloli oħra tal-ġilda. Iċ-ċelloli li jġarrbu ħsara jistgħu jeħilsu medjaturi infjammatorji jew inkella jinduċu kaskata infjammatorja li wkoll taġixxi fuq iċ-ċelloli fid-*dermis*, b'mod partikolari ċ-ċelloli stromali u edoteljali tal-važi. Hi d-dilazzjoni u l-permeabbiltà akbar taċ-ċelloli endoteljali li jipproduċu l-eritema u l-edema osservati (29). B'mod partikolari, il-metodi ta' ttestjar bbażati fuq l-RhE, fin-nuqqas ta' kwalunkwe vaskolarizzazzjoni fis-sistema ta' ttestjar *in vitro*, ikejlu l-avvenimenti tal-bidu fil-kaskata, eż. ħsara fiċ-ċelloli / fit-tessuti (16) (17), bl-użu tal-vijabbiltà bħala readout.

14. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli fil-mudelli tal-RhE titkejjel b'konverżjoni enzimatika tal-kulurant vitali MTT [bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5- difeniltetrażolju, blu tjażolil; Numru CAS 298-93-1], f'melħ tal-formażan blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (31). Sustanzi kimiċi irritanti huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà taċ-ċelloli taħt il-livelli limitu definiti (jiġifieri ≤ 50 %, għall-GHS tan-NU/għall-Kategorija 2 tas-CLP). Skont il-qafas regolatorju u l-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar, is-sustanzi kimiċi li jipproduċu l-vijabbiltajiet taċ-ċelloli ogħla mil-livell massimu definit, jistgħu jitqiesu bħala mhux irritanti (jiġifieri > 50 %, L-Ebda Kategorija).

▼M8

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

15. Qabel l-użu ta' rutina ta' kwalunkwe wieħed mill-erba' metodi ta' ttestjar validati li jaderixxu ma' dan il-metodu ta' ttestjar (Appendiċi 2), il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika, billi jużaw l-għaxar Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom, pereżempju, sustanza elenkata ma tkunx disponibbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (8)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1. L-użu ta' sustanza ta' profiċjenza alternattiva għandu jkun ġustifikat.

16. Bħala parti mill-ittestjar tal-profiċjenza, hu rrakkomandat li l-utenti jivverifikaw il-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-mudell tal-RhE. Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu ta' ttestjar ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun inkisbet u ntweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu ta' ttestjar b'rutina, hu rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

Tabella 1

Sustanzi ta' Profiċjenza [1]

Sustanza	NRU CAS	Punteġġ *in vivo* [2]	Stat fiżiku	Kategorija tal-GHS tan-NU
SUSTANZI MHUX KLASSIFIKATI (Nru tal-Kategorija tal-GHS tan-NU)				
aċidu naftalenaċetiku	86-87-3	0	Solidu	Ebda Kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Likwidi	Ebda Kat.
stearat tal-metil	112-61-8	1	Solidu	Ebda Kat.
butirat tal-ettil	5870-93-9	1,7	Likwidi	Ebda Kat. (*Kat. 3 Fakultattiva 3*) [3]
saliċilat tal-eżil	6259-76-3	2	Likwidi	Ebda Kat. (*Kat. 3 Fakultattiva 3*) [3]
SUSTANZI KLASSIFIKATI (Kategorija 2 tal-GHS tan-NU)				
aldeid taċ-ċiklamen	103-95-7	2,3	Likwidi	Kat. 2
1-bromoeżan	111-25-1	2,7	Likwidi	Kat. 2
idrossidu tal-potassju (5 % soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	3	Likwidi	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperażina	5271-27-2	3,3	Solidu	Kat. 2
ħeptanal	111-71-7	3,4	Likwidi	Kat. 2

[1] Is-Sustanzi ta' Profiċjenza huma subsett tas-sustanzi użati fl-istudju ta' validazzjoni u l-għażla hi bbażata fuq il-kriterji li ġejjin; (i), is-sustanzi kimiċi jkunu kummerċjalment disponibbli; (ii), dawn ikunu rappreżentattivi tal-medda sħiħa tal-punteġġi ta' irritazzjoni ta' Draize (minn mhux irritanti sa irritanti ħafna); (iii), ikollhom struttura kimika definita sew; (iv) ikunu rappreżentattivi tal-funzjonalità kimika użata fil-proċess ta' validazzjoni; (v) ikunu pprovdew riżultati *in vitro* riproduċibbli f'diversi testijiet u f'diversi laboratorji; (vi) ikunu ġew imbassra kif suppost *in vitro*, u (vii) ma jkunux assoċjati ma' profil estremament tossiku (eż. karċinoġeniku jew tossiku għas-sistema riproduttiva) u ma jkunux assoċjati ma' kostijiet projbittivi għar-rimi.

[2] Punteġġ *in vivo* skont it-TM B.4 (4).

[3] Skont dan il-metodu ta' ttestjar, il-Kategorija 3 (irritanti ħfief) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1) hi meqjusa bħala L-Ebda Kategorija.

▼M8

PROĊEDURA

17. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ta' metodu ta' ttestjar tal-RhE għall-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda (Ara wkoll l-Appendiċi 3 għall-parametri relatati ma' kull mudell tat-test). Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOPs) għall-erba' mudelli li jikkonformaw ma' dan il-metodu ta' ttestjar huma disponibbli (32) (33) (34) (35).

KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHE

Kundizzjonijiet ġenerali

18. Għandhom jintużaw keratinoċiti umani mhux trasformati biex jerġgħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegħ, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taħt *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali biex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi, *eż.* dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika referenzjarja tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment meħtieġ sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50 % (IC_{50}) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika referenzjarja b'konċentrazzjoni speċifika u fissa. Il-karatteristiċi ta' tażżin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-*istratum corneum* għat-tessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun ħieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

Kundizzjonijiet funzjonali

Vijabbiltà

19. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà hu l-assaġġ MTT (31). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhE jistgħu jnaqqsu l-MTT tal-kulurant vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). Id-densità ottika (OD) tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun ¿għira bi¿¿ejjed, jiġifieri OD < 0,1. L-MTT forma¿an estratt jista' jiġi kwantifikat bl-u¿u ta' kejl tal-assorbanza standard (OD) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (36). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom ji¿guraw li kull lott mill-mudell tal-RhE u¿at jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-Irritazzjoni tal-Ġilda) tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Meded tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tal-RhE validati inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar huma mogħtija fit-Tabella 2. Utent tal-Ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv huma stabbli fil-koltura (jipprovdu kejl tal-vijabbiltà simili) sakemm idum il-perjodu ta' esponiment tat-test.

Tabella 2

>Meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontrolli negattivi tal-mudelli tat-test inklużi f'dan it-TM

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Funzjoni ta' protezzjoni

20. L-*istratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed biex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi, *eż*. SDS jew Triton X-100, kif stmat minn IC_{50} jew ET_{50} (Tabella 3).

Morfoloġija

21. Għandu jiġi pprovdut eżami istoloġiku tal-mudell tal-RhE li juri struttura li tixbah l-*epidermis* uman (inkluż l-*istratum corneum* b'saffi multipli).

Riproduċibbiltà

22. Ir-riżultati tal-kontrolli pożittivi u negattivi tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà maż-żmien.

Kontroll tal-kwalità (QC)

23. Il-mudell tal-RhE għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-*vijabbiltà* (paragrafu 17), għall-*funzjoni ta' protezzjoni* (paragrafu 18) u għall-*morfoloġija* (paragrafu 19) huma l-aktar rilevanti. Din id-*data* għandha tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar, biex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-IC_{50} jew għall-ET_{50} għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Dawk ir-riżultati li huma prodotti b'tessuti kkwalifikati biss jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli ta' klassifikazzjoni tal-irritazzjoni. Il-meded tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tat-test inklużi f'dan it-TM huma mogħtija fit-Tabella 3.

Tabella 3

Il-kriterji tar-rilaxx tal-lott tal-QC tal-mudelli tat-test inklużi f'dan it-TM

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiSkin™ (SM) (trattament ta' 18-il siegħa b' SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 8,7 hr
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 10,0 hr
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (trattament ta' 18-il siegħa b' SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Applikazzjoni tas-Sustanza Kimika tat-Test u tas-Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

24. Tal-anqas għandhom jintużaw tliet repliki għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli f'kull sessjoni. Għas-sustanzi kimiċi likwidi kif ukoll għas-sustanzi kimiċi solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test biex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-*epidermis* filwaqt li tiġi evitata doża infinita, jiġifieri tvarja minn 26 sa 83 µl/cm^2 jew mg/cm^2 (ara l-Appendiċi 3). Għas-sustanzi kimiċi solidi, il-wiċċ tal-*epidermis* għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni, biex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u s-superfiċje tal-*epidermis*. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. F'ċerti każijiet tista' tintuża xibka tan-najlon bħala għajnuna għat-tifrix (ara l-Appendiċi 3). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinħasel bir-reqqa mill-*epidermis* b'superfiċje b'bafer milwiem, jew b'0,9 % NaCl. Skont il-mudelli tat-test tal-RhE użati, il-perjodu ta' esponiment ivarja bejn 15-il minuta u 60 minuta, u t-temperatura ta' inkubazzjoni bejn 20 u 37 °C. Dawn il-perjodi ta' esponiment u t-temperaturi huma ottimizzati għal kull metodu ta' ttestjar tal-RhE individwali u jirrappreżentaw il-proprjetajiet intrinsiċi differenti tal-mudelli tat-test (*eż.* il-funzjoni ta' protezzjoni) (ara Appendiċi 3).

25. F'kull sessjoni għandhom jintużaw kontroll negattiv (NC) u kontroll pożittiv (PC) konkorrenti biex jintwera li l-vijabbiltà (bl-użu tal-NC), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessuti li tirriżulta (bl-użu tal-PC) jinsabu fi ħdan medda ta' aċċettazzjoni storika definita. Il-PC suġġerit hu ta' SDS 5 % milwiemi. L-NCs suġġeriti huma ilma jew salina bbaferjata bil-fosfat (PBS).

Kejlijiet tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

26. Skont il-proċedura tat-test, hu essenzjali li l-kejl tal-vijabbiltà ma jsirx immedjatament wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test, iżda wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament twil biżżejjed tat-tessut imlaħlaħ f'medium ġdid. Dan il-perjodu jippermetti kemm l-irkupru minn effetti ċitotossiċi dgħajfa kif ukoll il-manifestazzjoni tal-effetti ċitotossiċi b'mod ċar. Perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament ta' 42 siegħa nstab li kien ottimali matul l-ottimizzazzjoni tat-test ta' tnejn mill-mudelli tat-test ibbażati fuq l-RhE li huma l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar (11) (12) (13) (14) (15).

27. L-assaġġ tal-MTT hu metodu kwantitattiv standardizzat li għandu jintuża biex ikejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli taħt dan il-metodu ta' ttestjar. Hu kompatibbli mal-użu f'bini ta' tessut tridimensjonali. Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni tal-MTT b'konċentrazzjoni xierqa (*eż.* 0,3 jew 1 mg/ml) għal tliet siegħat. L-MTT jiġi kkonvertit f'formażan blu miċ-ċelloli vijabbli. Imbagħad il-prodott preċipitat formażan blu jiġi estratt mit-tessuti permezz ta' solvent (e.g., isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażan titkejjel billi tiġi determinata l-OD f'570 nm permezz ta' filtru band pass sa massimu ta' ±30 nm, jew bl-użu ta' proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafu 34) (36).

28. Il-proprjetajiet ottiċi tas-sustanza kimika tat-test jew l-azzjoni kimika tagħha fuq l-MTT (eż. is-sustanzi kimiċi jistgħu jipprevjenu jew ireġġgħu lura l-ġenerazzjoni tal-kulur kif ukoll jikkawżawha) jistgħu jinterferixxu mal-assaġġ u jwasslu għal stima falza tal-vijabbiltà. Dan jista' jseħħ meta sustanza kimika tat-test speċifika ma titneħħiex kompletament mit-tessut bi tlaħliħ jew meta din tippenetra l-*epidermis*. Jekk sustanza kimika tat-test

▼M8

taġixxi direttament fuq l-MTT (*eż.* riduċenti tal-MTT), ikollha kulur naturali, jew issir ikkulurita matul it-trattament tat-tessut, għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex jiġu identifikati u kkoreġuti l-interferenzi tas-sustanzi kimiċi tat-test mat-teknika ta' kejl tal-vijabbiltà (ara l-paragrafi 29 u 33). Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs għall-erba' mudelli validati inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar (32) (33) (34) (35).

29. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tiżdied ma' soluzzjoni MTT preparata ġdida. Jekk it-taħlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod direct l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq it-tessuti tal-RhE mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali tħaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu s-sustanza kimika tat-test b'mod simili bħal tessuti vijabbli. Kull sustanza kimika tat-test li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula li ssirilhom il-proċedura sħiħa ta' ttestjar biex jiġi ġġenerat tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Kontroll tal-NSMTT wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa. Imbagħad, il-vijabbiltà tat-tessuti veru tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għar-riduċent tal-MTT nieqes it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess riduċent tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSMTT).

30. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti jew mis-sustanzi kimiċi tat-test li jitlewnu meta jidħlu f'kuntatt mal-ilma jew mal-isopropanol u tittieħed deċiżjoni dwar il-ħtieġa ta' kontrolli addizzjonali, għandha ssir analiżi spettrali tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma (ambjent matul l-esponiment) u/jew fl-isopropanol (soluzzjoni tal-estrazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi d-dawl fil-medda ta' 570 ± 30 nm, għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-kolorant jew inkella għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 33 u 34). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test imlewna li tinterferixxi tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli, li ssirilhom il-proċedura sħiħa ta' ttestjar iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC_{living}). Il-kontroll tal-NSC_{living} irid jitwettaq fl-istess ħin bħall-ittestjar tas-sustanza kimika tat-test ikkulurita u f'każ ta' ttestjar multiplu, irid jitwettaq kontroll indipendenti tal-NSC_{living} li għandu jsir b'kull test imwettaq (f'kull sessjoni) minħabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT nieqes il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC_{living}).

31. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 29) u interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 30) se jkunu jeħtieġu t-tielet sett ta' kontrolli wkoll, minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC_{living} deskritti fil-paragrafi ta' qabel, meta jitwettaq il-kejl tal-assorbanza standard (OD). Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti skuri li jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT (eż. blu, vjola,

▼**M8**

suwed) minħabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 29. Dawn is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jitgħaqqdu kemm ma' tessuti ħajjin kif ukoll ma' dawk maqtula u, għalhekk, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test, iżda anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC_{living} diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSC_{killed}). F'dan il-kontroll addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula, li ssirilhom il-proċedura tal-ittestjar sħiħa iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC_{killed} wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa, iżda għandu jsir fl-istess ħin mal-kontroll tal-NSMTT u, fejn possibbli, bl-istess lott ta' tessuti. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT nieqes il- $\%NSC_{living}$ flimkien mal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut ($\%NSC_{killed}$).

32. Ta' min jinnota li t-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku u l-interferenzi tal-kulur mhux speċifiku jistgħu jżidu l-kejl tal-estratt tat-tessut f'livell ogħla mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-bażi, kull laboratorju għandu jiddetermina l-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru tiegħu bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7) minn sors kummerċjali qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji. Il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu tal-ispettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur meta l-ODs tal-estratti tat-tessuti miksuba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal tnaqqis dirett tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi ħdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru jew meta l-vijabbiltà perċentwali mhux ikkoreġuta miksuba bis-sustanza kimika tat-test diġà tkun ≤ 50 %. Minkejja dan, ir-riżultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew $\%NSC_{living}$ ≥ 50 % tal-kontroll negattiv għandhom jittieħdu b'attenzjoni peress li dan hu l-limitu użat biex jiġu distinti s-sustanzi kimiċi klassifikati minn dawk mhux klassifikati (ara l-paragrafu 36).

33. Għal sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti li ma jkunux kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) minħabba interferenza qawwija wisq mal-assaġġ MTT, tista' titħaddem il-proċedura alternattiva tal-ispettrofotometrija HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafu 34) (36). Is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika tat-test qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (36). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC_{living} jew tal-NSC_{killed} qatt ma jkunu meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta waħda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas b'mod dirett l-MTT jew ikollha kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità ta' tnaqqis dirett tal-MTT (kif deskritt fil-paragrafu 29). Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti

▼M8

għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT li jistgħu jkunu interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal Ods (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-ogħla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma jistgħux jiġu vvalutati, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħħu f'sitwazzjonijiet rari ħafna biss.

34. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża wkoll bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażan MTT (36). Minħabba d-diversità tas-sistemi tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' dawk deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bijoanaliticiċi (36)(37). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 4. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 4, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażan MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

35. Għal kull metodu ta' ttestjar li juża lottijiet tal-mudell tal-RhE validi (ara l-paragrafu 23), it-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv għandhom jimmanifestaw OD li tirrefletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-passi ta' kunsinna u riċevuta u l-proċessi kollha tal-protokoll. Il-valuri ta' kontroll tal-OD ma għandhomx ikunu aktar baxxi mil-limiti storikament stabbiliti. B'mod simili, it-tessuti trattati bil-PC, jiġifieri SDS 5 % milwiema, għandhom jirriflettu l-ħila tagħhom li jwieġbu għal sustanza kimika irritanti taħt il-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (ara l-Appendiċi 3 u għal aktar informazzjoni l-SOPs tal-erba' mudelli tat-test inklużi f'din it-TG (32) (33) (34) (35)). Il-kejlijiet assoċjati u xierqa tal-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti, jiġifieri d-devjazzjonijiet standard (SD) għandhom jaqgħu fi ħdan il-limiti tal-aċċettazzjoni stabbiliti għall-mudell tat-test użat (ara l-Appendiċi 3).

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir

36. Il-valuri tal-OD miksuba minn kull sustanza kimika tat-test jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' vijabbiltà normalizzat għall-kontroll negattiv, li hu stabbilit għal 100 %. F'każ li tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Il-valur ta' limitu tal-perċentwal tal-vijabbiltà ta' ċellola li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test irritanti minn dawk mhux klassifikati u l-proċedura/i statistika/statistiki użata/i biex jiġu evalwati r-riżultati u jiġu identifikati s-sustanzi kimiċi irritanti għandhom jiġu ddefiniti u dokumentati b'mod ċar u għandu jintwera li dawn huma xierqa (ara l-SOPs tal-mudelli tat-test għal informazzjoni). Il-valuri ta' limitu għat-tbassir tal-irritazzjoni huma pprovduti hawn taħt:

▼M8

— Is-sustanza kimika tat-test hi identifikata bħala waħda li teħtieġ klassifikazzjoni u tikkettar skont il-GHS tan-NU/is-CLP (Kategorija 2 jew Kategorija 1) jekk il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali medja wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun anqas jew daqs (≤) 50 %. Peress li l-mudelli tat-test tal-RhE koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistgħux jiddistingwu bejn il-Kategoriji 1 u 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, se jkun hemm bżonn ta' informazzjoni ulterjuri dwar il-korrużjoni tal-ġilda biex jiġi deċiż dwar il-klassifikazzjoni finali tagħha [ara woll id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-IATA (3)]. Fil-każ li s-sustanza kimika tat-test tinstab li ma tkunx korrużiva (eż. ibbażata fuq it-TM.40, B.40bis jew B.65), u turi vijabbiltà tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun anqas jew daqs (≤) 50 %, is-sustanza kimika tat-test titqies li tkun irritanti għall-ġilda skont il-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/is-CLP.

— Skont il-qafas regolatorju fil-pajjiżi membri, is-sustanza kimika tat-test tista' titqies bħala mhux irritanti għall-ġilda skont L-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP jekk il-vijabbiltà tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun aktar (>) minn 50 %.

DATA U RAPPORTAR

Data

37. Għal kull sessjoni, id-*data* mit-tessuti replikati individwali (eż. valuri tal-OD u *data* dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-*data* minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-SD ± medji għal kull sessjoni. Interazzjonijiet osservati mar-reaġent u s-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti tal-MTT għandhom jiġu rrapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

Rapport tat-Test

38. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u kwalunkwe proprjetà fiżikokimika rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (*eż*., it-tisħin, it-ħin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Il-mudell u l-protokoll tal-RhE użati (u l-ħsieb għall-għażla, jekk applikabbli)

▼**M8**

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-mudell tal-RhE użat (inkluż in-numru tal-lott);

— Informazzjoni dwar il-kalibrazzjoni għall-apparat tal-kejl (*eż.* spettrofotometru), it-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl; Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT;

— Deskrizzjoni tal-kwantifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, jekk applikabbli; Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din l-informazzjoni għandha tiġi inkluża, iżda ma għandhiex tkun limitata għal dawn:

i) Il-vijabbiltà;

ii) Il-funzjoni ta' protezzjoni;

iii) Il-morfoloġija;

iv) Ir-riproduċibbiltà u l-prevedibbiltà;

v) Il-kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell;

— Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma tkunx limitata għall-aċċettabbiltà tad-*data* tal-QC b'referenza għad-*data* tal-lottijiet storiċi.

— Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza.

Proċedura tat-Test:

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata (inklużi l-proċeduri ta' ħasil użati wara l-perjodu ta' esponiment); Doża tas-sustanza kimika tat-test u tal-kontrolli użati;

— Durata u temperatura tal-perjodu ta' esponiment u tal-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment;

— Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur, jekk applikabbli;

— In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (PC, kontroll negattiv, u NSMTT, NSC_{living} u NSC_{killed}, jekk applikabbli);

— Deskrizzjoni tal-kriterji tad-deċiżjonijiet/tal-mudell tat-tbassir applikati fuq il-bażi tal-mudell tal-RhE użat;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika fil-proċedura tat-test (inklużi l-proċeduri tal-ħasil).

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test:

— Il-valuri medji tal-kontroll pożittiv u negattiv u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika; Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;

▼**M8**

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test.

Ir-riżultati:

— Tabultazzjoni tad-*data* għal sustanza kimika tat-test individwali għal kull sessjoni u kull kejl tar-repliki inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti u l-SD;

— Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, SD, il-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessuti;

— Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bil-kontrolli b'rabta mas-sessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

— Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, NU New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Dikjarazzjoni dwar il-"Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC31), 9 ta' April 2009. Disponibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(4) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermali Akuta.

(5) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Ir-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER).

(6) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit (RHE).

(7) Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.

▼**M8**

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. u Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. u Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. u Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. u Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. u Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. u Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. u Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. u Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. u Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Dikjarazzjoni dwar il-Validità tat-Testijiet *In Vitro* għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC26), 27 ta' April 2007. Disponibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. Dawn huma l-PS oriġinali użati għall-validazzjoni taż-żewġ metodi ta' ttestjar. Dawn il-PS ma għandhomx jibqgħu jintużaw peress li issa hemm verżjoni aġġornata (8) disponibbli.*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjentifika tat-Testijiet *In Vitro* għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC29), 5 ta' Novembru 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. u Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. u Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. u Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. u Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (Frar 2009). SOP, Verżjoni 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Riveduta Marzu 2009). SOP, Verżjoni 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (Ġunju 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., u McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Il-manuskritt għadu qed jitħejja.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mejju 2001. Disponibbli fuq: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., u Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, fi: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. Din hi l-verżjoni kurrenti tal-PS tal-ECVAM, aġġornata fl-2009 fid-dawl tal-implimentazzjoni tal-GHS tan-NU. Dawn il-PS ma għandhomx jibqgħu jintużaw peress li issa hemm verżjoni aġġornata (8) disponibbli relatata mat-TG preżenti.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). Dikjarazzjoni tal-ESAC dwar l-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) għall-Ittestjar tal-Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro* bl-użu ta' Epidermis Uman Rikostitwit, Maħruġa mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC31), 8 ta' Lulju 2009.

(41) KE (2001). Id-Direttiva tal-kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awwissu 2001 li taddatta għall-progress tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikoluži, il-*Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea* L225, 1-333.

▼M8

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' konkordanza biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (9).

Vijabbiltà taċ-ċelloli: Il-parametru li jkejjel l-attività sħiħa tal-popolazzjoni ċellulari *eż.* il-kapaċità tad-deidroġenaži mitokondrijali ċellulari biex titnaqqas is-sustanza koloranti vitali MTT ([bromur tat-3-(4,5-Dimetiltijażol l-2-il)-2,5-difeniltetrażolju, blu tijażolil;), li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, tikkorrispondi għall-għadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

Sustanza kimika: tfisser sustanza jew taħlita.

Konkordanza: Dan hu kejl tal-prestazzjoni għal mudelli tat-test li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (9).

ET_{50}: Jista' jiġi stmat bid-determinazzjoni tal-ħin tal-esponiment meħtieġ biex il-vijabbiltà taċ-ċelloli titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika ta' riferiment f'konċentrazzjoni speċifikata fissa, ara wkoll IC_{50}.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi min-Nazzjonijiet Uniti (NU)): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

HPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja.

IATA: Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

IC_{50}: Tista' tiġi stmata bid-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, ara wkoll ET_{50}.

Doża infinita: Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-*epidermis* lil hinn mill-ammont meħtieġ biex tinkesa b'mod sħiħ u uniformi s-superfiċje tal-*epidermis*.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

▼M8

MTT: Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

NSC_{killed}: Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

NSC_{living}: Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti ħajjin.

NSMTT: Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

Standards tal-prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (9).

PC: Kontroll Pożittiv, Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza kimika li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (9).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (9).

Test ta' sostituzzjoni: Test li hu mfassal biex jieħu post test li hu f'użu ta' rutina u aċċettat għall-identifikazzjoni tal-perikli u/jew għall-valutazzjoni tar-riskji, u li ġie determinat li jipprovdi protezzjoni ekwivalenti jew imtejba tas-saħħa tal-bniedem jew tal-annimali jew tal-ambjent, skont kif ikun applikabbli, meta mqabbel mat-test aċċettat, għas-sitwazzjonijiet u għas-sustanzi kimiċi ta' ttestjar possibbli kollha (9).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' PC.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

▼**M8**

Irritazzjoni tal-ġilda *in vivo*: Il-produzzjoni ta' ħsara riversibbli fuq il-ġilda wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test għal massimu ta' erba' sigħat. Irritazzjoni tal-ġilda hi reazzjoni lokali tat-tessut tal-ġilda affettwat u li tidher ftit wara l-istimolazzjoni (38). Hi kkawżata minn reazzjoni infjammatorja lokali li tinvolvi s-sistema immuni innata (mhux speċifika) tat-tessut tal-ġilda. Hi karatterizzata primarjament minn proċess riversibbli li jinvolvi reazzjonijiet infjammatorji u ħafna mis-sinjali karatteristiċi kliniċi ta' irritazzjoni (eritema, edema, ħakk u uġigħ) relatati mal-proċess ta' infjammazzjoni.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif' suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull additttiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qed tiġi ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Ħafna.

UVCB: sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

▼**M8**

Appendiċi 2

MUDELLI TAT-TEST INKLUŻI F'DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

Nru	Isem tal-mudell tat-test	Tip ta' studju ta' validazzjoni	Referenzi
1	EpiSkin™	Studju ta' validazzjoni prospettiv sħiħ (2003-2007). Il-komponenti ta' dan il-mudell intużaw biex jiġu definiti l-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar oriġinali u aġġornat tal-PS tal-ECVAM (39) (40) (21) (*). Barra minn hekk, id-*data* tal-metodu relatata mal-identifikazzjoni ta' sustanzi mhux klassifikati kontra dawk klassifikati fformat il-bażi ewlenija għad-definizzjoni tal-valuri tal-ispeċifiċità u tas-sensittività tal-PS oriġinali (*)	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*oriġinali*): Għall-ewwel il-mudell tat-test saritlu validazzjoni prospettiva sħiħa flimkien man-Nru 1 mill-2003-2007. Il-komponenti ta' dan il-mudell intużaw biex jiġu definiti l-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar oriġinali u aġġornat tal-PS tal-ECVAM (39) (40) (21) (*) **EpiDerm™ SIT (EPI-200)**: Modifika tal-EpiDerm™ oriġinali ġiet validata bl-użu tal-PS oriġinali tal-ECVAM (21) fl-2008 (*)	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Studju ta' validazzjoni bbażat fuq l-Istandards tal-Prestazzjoni oriġinali tal-ECVAM (21) fl-2008 (*)	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Studju ta' validazzjoni (2011-2012) ibbażat fuq l-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) tat-TG 439 (8) tal-OECD li huma bbażati fuq il-PS (*) aġġornat tal-ECVAM (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) u l-PS ta' din it-TG (8) (*)

(*) L-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) oriġinali tal-ECVAM (21) ġew żviluppati fl-2007 mat-tlestija tal-istudju ta' validazzjoni prospettiv (16) li kien ivvaluta l-prestazzjoni tal-mudelli tat-test Nri 1 u 2 b'rabta mas-sistema ta' klassifikazzjoni kif deskritta fit-28 emenda tad-Direttiva tal-UE dwar is-Sustanzi Perikoluż (41). Fl-2008 ġew introdotti l-GHS tan-NU (1) u s-CLP tal-UE, li b'mod effettiv mexxew il-valur ta' limitu għad-distinzjoni bejn sustanzi mhux klassifikati u dawk klassifikati minn punteġġ *in vivo* ta' 2,0 għal 2,3. Biex jiġi adattat għal dan ir-rekwiżit regolatorju mibdul, il-valuri referenzjarji u l-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment tal-PS tal-ECVAM ġew aġġornati fl-2009 (2) (39) (40). Bħall-PS oriġinali, anki l-PS aġġornati kienu primarjament ibbażati fuq *data* mill-mudelli Nru 1 u 2 (16), iżda użaw ukoll *data* dwar is-sustanzi kimiċi ta' riferiment mill-mudell Nru 3. Fl-2010, intużaw il-PS aġġornati tal-ECVAM għall-istipular tal-PS b'rabta ma' din it-TG (8). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, EpiSkin™ hu kkunsidrat il-VRM, minħabba l-fatt li kien intuża biex jiġu żviluppati l-kriterji kollha tal-PS. Informazzjoni dettaljata dwar l-istudji ta' validazzjoni, kompilazzjoni tad-*data* ġenerata kif ukoll l-isfond għall-adattamenti neċessarji tal-PS bħala konsegwenza tal-implimentazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP jistgħu jinkisbu mid-dokument ta' spjegazzjoni ta' sfond tal-ECVAM/BfR għat-TG 439 korrispondenti tal-OECD (23).

SIT: Test tal-Irritazzjoni tal-Ġilda

RHE: Epidermis Uman Rikostitwit

▼**M8**

Appendiċi 3

PARAMETRI TAL-PROTOKOLL SPEĊIFIĊI GĦAL KULL WIEĦED MILL-MUDELLI TAT-TEST INKLUŻI F'DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

Il-mudelli tal-RhE juru protokolli simili ħafna u b'mod partikolari lkoll jużaw perjodu ta' wara l-inkubazzjoni ta' 42 siegħa (32) (33) (34) (35). Il-varjazzjonijiet jikkonċernaw primarjament tliet parametri relatati mal-funzjonijiet differenti ta' protezzjoni tal-mudelli tat-test u elenkati hawn: A) ħin u volum ta' qabel l-inkubazzjoni, B) Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u C) Volum ta' wara l-inkubazzjoni.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Preinkubazzjoni				
Ħin ta' inkubazzjoni	18- 24 siegħa	18-24 siegħa	< sagħtejn (2)	15-30 siegħa
Volum medju	2ml	0,9 ml	0,3 jew 1ml	0,5 ml
B) Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test				
Għal likwidi	10µl (26µl/cm^2)	30µl (47µl/cm^2)	16µl (32µl/cm^2)	25µl (83µl/cm^2)
Għal solidi	10mg (26mg/cm^2) + DW (5µl)	25mg (39mg/cm^2) + DPBS (25µl)	16mg (32mg/cm^2) + DW (10µl)	25mg (83mg/cm^2) + DW (25µl)
Użu ta' xibka tan-najlon	Ma ntużatx	Jekk ikun hemm bżonn	Applikata	Ma ntużatx
Ħin totali tal-applikazzjoni	15-il minuta	60 minuta	42 minuta	15-il minuta
Temperatura tal-applikazzjoni	RT	a) f'RT għal 25 minuta b) f'37°C għal 35 minuta	RT	RT
C) Volum ta' wara l-inkubazzjoni				
Volum medju	2 ml	0,9ml x 2	2 ml	1 ml
D) Varjabbiltà aċċettabbli massima				
Devjazzjoni standard bejn ir-repliki tat-tessuti	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: Temperatura ambjentali
DW: ilma distillat
DPBS: Salina tal-Bafer tal-Fosfat ta' Dulbecco

▼**M8**

Appendiċi 4

PARAMETRI EWLENIN U KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI GĦALL-KWALIFIKAZZJONI TA' SISTEMA TAL-ISPETTROFOTOMETRU TA' HPLC/UPLC GĦALL-KEJL TAL-FORMAŻAN MTT ESTRATT MIT-TESSUTI TAL-RHE

Parametru	Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (36) (37)	Kriterji ta' Aċċettazzjoni
Selettività	Analiżi tal-isopropanol, inbjank ħaj (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE ħajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE maqtula mingħajr ebda trattament)	$Area_{interference} \leq 20$ % ta' $Area_{LLOQ}$ ([1])
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità (jiġifieri formażan MTT f'1,6 µg/ml, 16 µg/ml u 160 µg/ml) fl-isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Effett tal-Matriċi	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=5)	85 % ≤ Effett tal-Matriċi % ≤ 115 %
Riport	Analiżi tal-isopropanol wara ULOQ ([2]) standard	$Area_{interference} \leq 20$ % tal-$Area_{LLOQ}$
Riproduċibbiltà (dakinhar)	Tliet kurvi ta' kalibrazzjoni indipendenti (fuq il-bażi ta' sitt dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekuttivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jiġifieri 200 µg/ml); Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	Kurvi ta' Kalibrazzjoni: %Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ Kontrolli tal-Kwalità: %Dev ≤ 15 % u CV ≤ 15 %
Riproduċibbiltà (bejn ġranet differenti)	Jum 1:: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 2:: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 3:: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)	
Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' ħżin f'temperatura ambjentali	%Dev ≤ 15 %
Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE, jekk meħtieġa	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' ħżin f'temperatura speċifikata (eż. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jiġifieri 0,8 µg/ml.

([2]) ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi, jiġifieri 200 µg/ml.

▼M7

B.47. METODU TAT-TEST TAL-OPAĊITÀ U L-PERMEABILITÀ TAL-KORNEA FIL-BOVINI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' I) SUSTANZI KIMIĊI LI JINDUĊU ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN U II) SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GĦAL IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 437 tal-OECD (2013). Il-metodu tat-test tal-Opaċità u l-Permeabilità tal-Kornea fil-Bovini ġie evalwat mill-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interaġenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM), flimkien maċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Ċentru Ġappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM), fl-2006 u l-2010 (1)(2). Fl-ewwel evalwazzjoni, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ġie evalwat għall-utilità tiegħu sabiex jidentifika sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (1). Fit-tieni evalwazzjoni, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ġie evalwat għall-utilità tiegħu sabiex jidentifika sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) mhux klassifikati għal irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn (2). Id-database tal-validazzjoni tal-BCOP kien fiha 113-il sustanza u 100 taħlita b'kollox (2)(3). Minn dawn l-evalwazzjonijiet u r-reviżjoni bejn il-pari tagħhom, ġie konkluż li l-metodu ta' ttestjar jista' jidentifika kif suppost sustanzi kimiċi (kemm sustanzi kif ukoll taħlitiet) li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1) kif ukoll dawk li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) (4) u r-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) ([1]) u, għaldaqstant, ġie approvat bħala xjentifikament validu għal dawn iż-żewġ skopijiet. Ħsara serja lill-għajnejn hija l-produzzjoni ta' tibdiliet fl-għajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wiċċ quddiemi tal-għajn, li ma jkunux riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn huma klassifikati fil-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU. Is-sustanzi kimiċi mhux ikklassifikati għal irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn huma definiti bħala dawk li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU, jiġifieri huma msejħin bħala Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU. Dan il-metodu ta' ttestjar jinkludi l-użu rakkomandat u l-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP fuq il-bażi tal-evalwazzjonijiet tiegħu. Id-differenzi ewlenin bejn il-verżjoni oriġinali tal-2009 u l-verżjoni aġġornata tal-2013 tal-linja gwida tat-test tal-OECD jikkonċernaw, iżda mhumiex limitati għal: l-użu tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni skont il-GHS tan-NU (paragrafi 2 u 7); kjarifiki fuq l-applikabilità tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għall-ittestjar ta' alkoħols, ketoni u solidi (paragrafi 6 u 7) u ta' sustanzi u taħlitiet (paragrafu 8); kjarifiki fuq kif għandhom jiġu testjati sustanzi tensjoattivi u taħlitiet li fihom tensjoattivi (paragrafu 28); aġġornamenti u kjarifiki dwar il-kontrolli pożittivi (paragrafi 39 u 40); aġġornament tal-kriterji dwar id-deċiżjoni tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP (paragrafu 47); aġġornament tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju (paragrafu 48); aġġornament fl-elementi tar-rapport tat-test (paragrafu 49); aġġornament tal-Appendiċi 1 dwar id-definizzjonijiet; iż-żieda tal-Appendiċi 2 tal-kapaċità ta' previżjoni tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP skont id-diversi sistemi ta' klassifikazzjoni; aġġornament tal-Appendiċi 3 fuq il-lista ta' sustanzi kimiċi tal-profiċjenza; u aġġornament tal-Appendiċi 4 dwar l-apparat fejn titqiegħed il-kornea tal-BCOP (paragrafu 1) u dwar l-opaċitometru (paragrafi 2 u 3).

([1]) Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1

▼M7

Ġeneralment huwa aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test *in vitro* tal-irritazzjoni tal-għajnejn waħdu ma huwa sejjer ikun kapaċi jieħu post it-test Draize *in vivo* tal-għajnejn sabiex ibassar il-medda sħiħa ta' irritazzjonijiet għal klassijiet ta' sustanzi kimiċi differenti. Madankollu, taħlitiet strateġiċi ta' diversi metodi ta' ttestjar alternattivi fi ħdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu kapaċi jieħdu post it-test Draize tal-għajnejn (5). L-approċċ minn Fuq għal Isfel (5) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija li jkollha potenzjal għoli ta' irritazzjoni, filwaqt li l-approċċ minn Isfel għal Fuq (5) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika ma tkunx mistennija tikkaġuna biżżejjed irritazzjoni tal-għajnejn sabiex tkun teħtieġ li tiġi kklassifikata. Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti ċirkustanzi u fi ħdan limitazzjonijiet speċifiċi għall-klassifikazzjoni tal-periklu għall-għajnejn u t-tikkettar ta' sustanzi kimiċi. Filwaqt li ma jitqiesx li huwa validu bħala sostitut awtonomu għat-test *in vivo* tal-għajnejn fuq il-fniek, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa rakkomandat bħala pass inizjali fi ħdan strateġija ta' ttestjar, bħall-approċċ minn Fuq għal Isfel issuġġerit minn Scott *et al*. (5) sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn, jiġifieri sustanzi kimiċi li jiġu klassifikati fil-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, mingħajr ma jsiru iktar testijiet (4). Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa rakkomandat ukoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, kif definiti mill-GHS tan-NU (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU) (4) fi ħdan strateġija ta' ttestjar bħall-approċċ minn Isfel għal Fuq (5). Madankollu, sustanza kimika li mhijiex prevista li tikkaġuna ħsara serja lill-għajnejn jew bħala mhux klassifikata għal irritazzjoni tal-għajnejn/ħsara serja lill-għajnejn bil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP tkun teħtieġ iktar testijiet (*in vitro* u/jew *in vivo*) sabiex tistabbilixxi klassifikazzjoni definittiva.

L-għan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-għajen kif imkejjel mill-ħila tagħha li tinduċi opaċità jew żieda fil-permeabilità f'kornea bovina iżolata. L-effetti tossiċi għall-kornea jitkejlu bi: (i) trażmissjoni mnaqqsa tad-dawl (opaċità), u (ii) żieda fil-passaġġ tal-kulurant fluworexxein tas-sodju (permeabilità). Il-valutazzjonijiet tal-opaċità u l-permeabilità tal-kornea wara esponiment għas-sustanza kimika tat-test jingħaqdu għall-kisba ta' Punteġġ tal-Irritazzjoni *In Vitro* (IVIS), li jintuża sabiex jiġi kklassifikat il-livell ta' irritazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP tal-ICCVAM (6)(7), li oriġinarjament kien żviluppat minn informazzjoni miksuba mill-Istitut għall-protokoll tax-Xjenzi *in vitro* (IIVS) u l-Protokoll 124 tal-INVITTOX (8). Dan tal-aħħar jirrappreżenta l-protokoll użat għall-istudju ta' prevalidazzjoni sponsorjat mill-Komunità Ewropea li sar fl-1997-1998. Dawn iż-żewġ protokolli kienu bbażati fuq il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP irrapportat għall-ewwel darba minn Gautheron *et al*. (9).

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jista' jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn kif definiti mill-GHS tan-NU, jiġifieri sustanzi kimiċi li jiġu klassifikati taħt il-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU (4). Meta jintuża għal dan il-għan, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 79 % (150/191), rata ta' foloz pożittivi ta' 25 % (32/126), rata ta' foloz negattivi ta' 14 % (9/65), meta mqabbel mad-dejta tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* tal-għajnejn tal-fniek ikklassifikat skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (3) (ara l-Appendiċi 2, Tabella 1). Meta s-sustanzi kimiċi tat-test fi ħdan ċerti klassijiet ta' sustanzi kimiċi (jiġifieri alkoħols, ketoni) jew fiżiċi (jiġifieri solidi) jiġu eskluži mid-database, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 85 % (111/131), rata ta' foloz pożittivi ta' 20 % (16/81), rata ta' foloz negattivi ta' 8 % (4/50) għas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (3). In-nuqqasijiet potenzjali tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP meta jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn

▼M7

(Kategorija 1 tal-GHS tan-NU) huma bbażati fuq ir-rati għoljin ta' foloz pożittivi għal alkoħols u ketoni u r-rata għolja ta' foloz negattivi għal solidi osservati fid-database dwar il-validazzjoni (1)(2)(3). Madankollu, peress li mhux l-alkoħols u l-ketoni kollha huma mbassra b'mod eċċessiv mill-metodu ta' ttestjar tal-BCOP u wħud huma mbassrin kif suppost bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, dawn iż-żewġ gruppi funzjonali organiċi ma jitqisux li jaqgħu barra mid-dominju ta' applikabilità tal-metodu ta' ttestjar. Huwa f'idejn l-utent ta' dan il-metodu ta' ttestjar li jiddeċiedi jekk previżjoni eċċessiva possibbli ta' alkoħol jew keton tistax tiġi aċċettat jew jekk għandhomx isiru iktar testijiet f'approċċ tal-piż tal-evidenza. Rigward ir-rati ta' foloz negattivi għas-solidi, ta' min jinnota li s-solidi jistgħu jwasslu għal kundizzjonijiet varjabbli u ta' esponiment estrem fit-test Draize *in vivo* tal-irritazzjoni tal-għajnejn, li jitsgħu jirriżultaw fi previżjonijiet irrilevanti tal-potenzjal ta' irritazzjoni veru tagħhom (10). Ta' min jinnota wkoll li l-ebda wieħed mill-foloz negattivi identifikati fid-database tal-validazzjoni tal-ICCVAM (2)(3), fil-kuntest ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU), ma rriżulta f'IVIS ≤ 3, li huwa l-kriterju użat sabiex sustanza kimika tat-test tiġi identiifkata bħala Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU. Barra minn hekk, f'dan il-kuntest il-foloz negattivi tal-BCOP mhumiex kritiċi peress li s-sustanzi kimiċi kollha tat-test li jipproduċu 3 < IVIS ≤ 55 imbagħad jiġu ttestjati b'testijiet *in vitro* validati adegwatament oħrajn, jew bħala l-aħħar alternattiva fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ tal-piż tal-evidenza. Peress li ċerti sustanzi kimiċi solidi huma previsti kif suppost mill-metodu ta' ttestjar tal-BCOP bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, dan l-istat fiżiku lanqas ma jitqies li ma jaqax taħt id-dominju tal-applikabilità tal-metodu ta' ttestjar. L-investigaturi għandhom jikkunsidraw jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, f'liema każ IVIS > 55 għandu jiġi aċċettat bħala indikatur ta' rispons inkluża ħsara serja lill-għajnejn li għandu jiġi klassifikat bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU mingħajr ma jsiru iktar testijiet. Madankollu, kif diġà ntqal, riżultati pożittivi miksuba bl-alkoħols jew il-ketoni għandhom jiġu interpretati b'ċerta kawtela minħabba potenzjal ta' tbassir żejjed.

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4). Meta jintuża għal dan il-għan, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 69 % (135/196), rata ta' foloz pożittivi ta' 69 % (61/89), rata ta' foloz negattivi ta' 0 % (0/107), meta mqabbel mad-dejta tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* tal-għajnejn tal-fniek ikklassifikat skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (3) (ara l-Appendiċi 2, Tabella 2). Ir-rata ta' foloz pożittivi miksuba (sustanzi kimiċi ta' Ebda Kategorija tal-GNS tan-NU li *in vivo* jipproduċi IVIS > 3, ara l-paragrafu 47) hija konsiderevolment għolja, iżda mhijiex kritika f'dan il-kuntest peress li s-sustanzi kimiċi kollha tat-test li jipproduċu 3 < IVIS ≤ 55 imbagħad jiġu ttestjati b'testijiet *in vitro* validati adegwatament oħrajn, jew bħala l-aħħar alternattiva fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ tal-piż tal-evidenza. Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ma juri ebda nuqqas speċifiku għall-ittestjar ta' alkoħols, ketoni u solidi meta l-iskop ikun li jiġu identifikati sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU) (3). L-investigaturi għandhom jikkunsidraw jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, f'liema każ riżultat negattiv (IVIS ≤ 3) għandu jiġi aċċettat bħala indikatur li ma hemm bżonn ta' ebda klassifikazzjoni (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU). Peress li l-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jista' jidentifika korrettament 31 % biss mis-sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, dan il-metodu ta' ttestjar ma għandux ikun l-ewwel għażla sabiex jinbeda approċċ minn Isfel għal Fuq (5), jekk ikun hemm metodi *in vitro* validati u aċċettati oħrajn b'sensittività għolja simili iżda speċifiċità għolja għad-dispożizzjoni.

▼M7

Id-database tal-validazzjoni tal-BCOP kien fiha 113-il sustanza u 100 taħlita b'kollox (2)(3). Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jitqies applikabbli għall-ittestjar taż-żewġ sustanzi u taħlitiet.

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP mhuwiex rakkomandat għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jiġu klassifikati bħala irritanti għall-għajnejn (Kategorija 2 jew Kategorija 2A tal-GHS tan-NU) jew sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jiġu klassifikati bħala ftit irritanti għall-għajnejn (Kategorija 2B tal-GHS tan-NU) minħabba n-numru konsiderevoli ta' sustanzi kimiċi tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU bħala sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU u ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU sovraklassifikati bħala Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU(2)(3). Għal dan il-għan, jista' jkun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet b'metodu xieraq ieħor.

Il-proċeduri kollha li jinvolvu għajnejn bovini u korneji bovini għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri applikabbli tal-istallazzjoni tal-ittestjar f'dak li għandu x'jaqsam mal-manipulazzjoni ta' materjali dderivati mill-annimali, li jinkludu, iżda li mhumiex limitati għal, tessuti u fluwidi tat-tessuti. Huwa rakkomandat li jittieħdu l-prekawzjonijiet universali tal-laboratorju (11).

Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ma jqisx feriti konġuntivali u iridali, jindirizza l-effetti korneali, li huma kawża primarja tal-klassifikazzjoni *in vivo* meta titqies il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU. Ir-reversibilità tal-feriti korneali ma tistax tiġi evalwata *per se* fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP. Ġie propost, abbażi ta' studji fuq għajnejn il-fniek, li valutazzjoni tal-fond inizjali tal-ferita fil-kornea tista' tintuża sabiex jiġu identifikati xi tipi ta' effetti riversibbli (12). Madankollu, hemm bżonn ta' iktar għarfien xjentifiku sabiex nifhmu kif iseħħu effetti irreversibbli mhux marbtin ma' ferita inizjali ta' livell għoli. Fl-aħħar nett, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ma jippermettix li ssir valutazzjoni tal-potenzjal għal tossiċità sistemika assoċjata ma' esponiment okulari.

Dan il-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi aġġornat kull ċertu żmien iktar ma jkun hemm informazzjoni u dejta ġodda kkunsidrati. Pereżempju, l-istopatoloġija tista' tkun potenzjalment siewja meta jkun hemm bżonn ta' karatterizzazzjoni iktar kompluta tal-ħsara fil-kornea. Ki spjegat fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 160 (13), dawk li jużawh huma mħeġġin jippreservaw il-kornei u jħejju kampjuni għall-istopatoloġija li jistgħu jintużaw sabiex jiġu żviluppati database u kriterji dwar id-deċiżjonijiet li jistgħu jkomplu jtejbu l-preċiżjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment jistabbilixxi dan il-metodu ta' ttestjar, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi tal-profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 3. Laboratorju jista' juża dawn is-sustanzi kimiċi sabiex juri l-kompetenza teknika tiegħu fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP qabel ma jissottometti dejta tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa mudell organotipiku li jipprovdi manutenzjoni fuq perjodu qasir tal-funzjoni fiżjoloġika u bijokimika normali tal-kornea tal-bovini *in vitro*. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-ħsara mis-sustanza kimika tat-test tiġi vvalutata minn kejl kwantitattiv ta' bidliet fl-opaċità u l-permeabilità tal-kornea permezz ta' opaċitometru u spettrofotometru ta' dawl viżibbli, rispettivament. Iż-żewġ tipi ta' kejl jintużaw sabiex jiġi kkalkolat IVIS, li jintuża sabiex tiġi assenjata kategorija ta' klassifikazzjoni tal-periklu ta' irritazzjoni *in vitro* għat-tbassir tal-potenzjal ta' irritazzjoni okulari tas-sustanza kimika tat-test *in vivo* (ara l-Kriterji tad-Deċiżjoni fil-paragrafu 48).

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP juża kornei iżolati mill-għajnejn ta' bhejjem li jkunu għadhom kemm inqatlu. L-opaċità tal-kornea titkejjel b'mod kwantitattiv bħala l-ammont ta' trażmissjoni ta' dawl minn ġol-kornea. Il-permeabilità titkejjel b'mod kwantitattiv bħala l-ammont ta' żebgħa fluworexxeina tas-sodju li jgħaddi

▼M7

min-naħa għall-oħra tal-ħxuna kollha tal-kornea, kif individwat fil-medium fil-kavità posterjuri. Is-sustanzi kimiċi tat-test, li jiġu introdotti fil-kavità anterjuri tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea, jiġu applikati fis-superfiċje tal-epitelju tal-kornea. L-Appendiċi 4 tipprovdi deskrizzjoni u dijagramma tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea użat fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP. L-apparat fejn titqiegħed il-kornea jista' jinxtara minn sorsi differenti jew jista' jinbena.

Is-Sors u l-Età tal-Għajnejn tal-Bovini u l-Għażla tal-Ispeċijiet tal-Annimali

Bhejjem mibgħuta l-biċċeriji tipikament jinqatlu jew għall-konsum mill-bniedem jew inkella għal użi kummerċjali oħrajn. Bħala sors ta' korneji għall-użu fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jintużaw biss l-annimali b'saħħithom li jitqiesu xierqa sabiex jidħlu fil-katina alimentari tal-bniedem. Minħabba li l-bhejjem għandhom skala wiesgħa ta' piżijiet, skont ir-razza, l-età u s-sess, mhemmx piż irrakkomandat għall-annimal meta jiġi biex jinqatel.

Meta jintużaw għajnejn minn annimali ta' età differenti jistgħu jirriżultaw varjazzjonijiet fid-dimensjonijiet tal-kornea. Korneji b'dijametru orizzontali > 30.5 mm u valuri tal-ħxuna ċentrali tal-kornea (CCT) ≥ 1 100 μm ġeneralment jinkisbu minn bhejjem li jkollhom aktar minn tmien snin, filwaqt li dawk b'dijametru orizzontali < 28.5 mm u CCT < 900 μm ġeneralment jinkisbu minn bhejjem li jkollhom anqas minn ħames snin (14). Minħabba f'hekk, tipikament ma jintużawx għajnejn minn bhejjem li jkollhom aktar minn 60 xahar. Għajnejn minn bhejjem li jkollhom anqas minn 12-il xahar tradizzjonalment ma ntużawx għaliex l-għajnejn ikunu għadhom qegħdin jiżviluppaw u l-ħxuna tal-kornea u d-dijametru tal-kornea jkunu iżgħar b'mod konsiderevoli minn dawk irrapportati għall-għajnejn mill-bhejjem adulti. Madankollu, l-użu ta' kornei minn annimali żgħar (jiġifieri ta' età minn 6 xhur sa 12-il xahar) huwa permess minħabba li hemm xi vantaġġi, bħal pereżempju disponibilità akbar, skala dejqa ta' etajiet, u inqas perikli marbuta ma' esponiment potenzjali tal-ħaddiema għall-Enċefalopatija Spongiforma Bovina (15). Minħabba li aktar evalwazzjoni tal-effett tad-daqs jew il-ħxuna tal-kornea fuq is-sensibilità għal sustanzi kimiċi korrużivi u irritanti tkun utli, l-utenti huma mħeġġin jirrapportaw stima tal-età u/jew il-piż tal-annimali li jipprovdu l-korneji użati fi studju.

Ġbir u Trasport tal-Għajnejn lejn il-Laboratorju

L-għajnejn jinġabru mill-impjegati tal-biċċerija. Sabiex jiġu minimizzati l-ħsara mekkanika u tipi oħrajn ta' ħsara lill-għajnejn, l-għajnejn għandhom jiġu enukleati mill-iktar fis wara l-mewt u jitkessħu minnufih wara l-enukleazzjoni u matul it-trasport. Sabiex jiġi evitat l-esponiment tal-għajnejn għal sustanzi kimiċi potenzjalment irritanti, il-ħaddiema tal-biċċerija ma għandhomx jużaw deterġent meta jlaħalħu ras l-annimal.

L-għajnejn għandhom jingħaddsu kompletament f'Soluzzjoni tal-Melħ Ekwilibrata mkessħa ta' Hanks, (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) f'reċipjent ta' daqs adattat, u ttrasportati lejn il-laboratorju b'mod li kemm jista' jkun inaqqas id-deterjorament u/jew il-kontaminazzjoni mill-batterji. Minħabba li l-għajnejn jinġabru waqt il-proċess tal-qatla, dawn jistgħu jiġu esposti għad-demm u għal materjali bijoloġiċi oħrajn, inklużi batterji u mikroorganiżmi oħrajn. Għalhekk huwa importanti li jiġi żgurat li r-riskju ta' kontaminazzjoni jitnaqqas kemm jista' jkun (eż. billi r-reċipjent li jkun fih l-għajnejn jinżamm fuq silġ imxarrab, billi jiżdiedu antibijotiċi fl-HBSS li tintuża għall-ħżin tal-għajnejn waqt it-trasport [eż. 100 IU/mL ta' peniċillina u 100 μg/ml ta' streptomiċina]).

L-intervall tal-ħin li jgħaddi minn meta jinġabru l-għajnejn u l-użu tal-kornei fil-BCOP għandu jitnaqqas kemm jista' jkun (tipikament għandhom jinġabru u jintużaw fl-istess ġurnata) u għandu jintwera li dan ma jikkompromettix ir-riżultati tal-assaġġ. Dawn ir-riżultati huma bbażati fuq il-kriterji tal-għażla għall-għajnejn, kif ukoll ir-risponsi tal-kontrolli pożittivi u negattivi. L-għajnejn kollha użati fl-assaġġ għandhom ikunu mill-istess grupp ta' għajnejn miġbura f'ġurnata speċifika.

Il-Kriterji tal-Għażla għall-Għajnejn Użati fil-Metodu ta' Ttestjar tal-BCOP

Malli jaslu fil-laboratorju, l-għajnejn jiġu eżaminati bir-reqqa għad-difetti inklużi żieda fl-opaċità, grif u neovaskularizzazzjoni. Għandhom jintużaw biss il-korneji minn għajnejn li ma jkollhom l-ebda difett ta' dan it-tip.

▼M7

Il-kwalità ta' kull kornea tiġi evalwata wkoll fi stadji li jiġu aktar 'il quddiem fl-assaġġ. Korneji li għandhom opaċità ikbar minn seba' unitajiet tal-opaċità jew ekwivalenti għall-opaċitometru u apparati fejn titqiegħed il-kornea wara perjodu ta' ekwilibrazzjoni inizjali ta' siegħa għandhom jintremew (*NOTA:* l-opaċitometru għandu jiġi kkalibrat bi standards tal-opaċità li jintużaw sabiex jiġu stabbiliti l-unitajiet tal-opaċità, ara l-Appendiċi 4).

Kull grupp tat-trattament (sustanza kimika tat-test, kontrolli negattivi u pożittivi paralleli) jikkonsisti minn minimu ta' tliet għajnejn. Fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għandhom jintużaw tliet korneji għall-kontroll negattiv. Minħabba li l-korneji kollha jinqatgħu barra mill-globu sħiħ, u jitqiegħdu fil-kavitajiet tal-korneji, il-manipulazzjoni tagħhom tista' tirriżulta f'artefatti fil-valuri tal-opaċità u l-permeabilità tal-korneji individwali (inkluż il-kontroll negattiv). Barra minn hekk, il-valuri tal-opaċità u l-permeabilità mill-korneji tal-kontroll negattiv jintużaw biex jikkoreġu l-valuri tal-opaċità u l-permeabilità tal-kornei ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u l-kornei ttrattati bil-kontroll pożittiv fil-kalkoli tal-IVIS.

PROĊEDURA

Preparazzjoni tal-Għajnejn

Korneji li ma jkollhom l-ebda difett jiġu dissezzjonati b'tali mod li jibqa' minn 2 sa 3 mm ta' xifer tal-isklerotika sabiex jgħin il-manipulazzjoni sussegwenti, u dan isir b'attenzjoni sabiex tiġi evitata kwalunkwe ħsara fl-epitelju u l-endotelju. Korneji iżolati jitqiegħdu f'apparat fejn titqiegħed il-kornea ddisinjat speċjalment għal dan il-għan li jikkonsisti f'kavitajiet anterjuri u posterjuri, li jkunu f'kuntatt mal-ġenb epiteljali u l-ġenb endoteljali tal-kornea, rispettivament. Iż-żewġ kavitajiet jimtlew sax-xifer bil-Medium Essenzjali Minimu ta' Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM) mingħajr fenol aħmar (l-ewwel il-kavità posterjuri), filwaqt li jiġi żgurat li ma jifformawx bżieżaq. L-apparat imbagħad jiġi kkalibrat għal tal-anqas siegħa f'temperatura ta' 32 ± 1 °C sabiex il-korneji jekwilibraw mal-medium u jiksbu kemm jista' jkun possibbli attività metabolika normali (it-temperatura approssimattiva tas-superfiċje tal-kornea *in vivo* hija 32 °C).

Wara l-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, EMEM frisk, mingħajr fenol aħmar u msaħħan minn qabel jiżdied fiż-żewġ kavitajiet u jittieħed l-ewwel qari tal-valuri tal-opaċità għal kull kornea. Kwalunkwe kornea li turi ħsara makroskopika fit-tessut (eż. grif, pigmentazzjoni, neovaskularizzazzjoni) jew opaċità ikbar minn seba' unitajiet tal-opaċità jew ekwivalenti għall-opaċitometru u l-apparati fejn titqiegħed il-kornea użati jintremew. Tal-inqas tliet korneji jintgħażlu bħala korneji tal-kontroll negattiv (jew solvent). Imbagħad, il-korneji li jifdal jiġu ddistribwiti fi grupp tat-trattament u tal-kontroll pożittiv.

Minħabba li l-kapaċità tas-sħana tal-ilma hija ogħla minn dik tal-arja, l-ilma jipprovdi kundizzjonijiet ta' temperatura aktar stabbli għall-inkubazzjoni. Għalhekk, huwa rrakkomandat l-użu ta' banju tal-ilma sabiex l-apparat fejn titqiegħed il-kornea u l-kontenut tiegħu jinżammu f'temperatura ta' 32 ± 1 °C. Madankollu, jistgħu jintużaw ukoll inkubaturi tal-arja, filwaqt li jittieħdu prekawzjonijiet sabiex tinżamm l-istabilità tat-temperatura (eż., billi l-apparat u l-media jissaħħnu minn qabel).

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Jintużaw żewġ protokolli ta' trattament, wieħed għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi (solidi jew likwidi), u ieħor għal solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi.

Il-likwidi jiġu ttestjati meta ma jkunux dilwiti. Semisolidi, kremi u x-xema' tipikament jiġu ttestjati bħala likwidi. Sustanzi tensjoattivi puri jiġu ttestjati f'konċentrazzjoni ta' 10 % w/v f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0.9 %, ilma distillat, jew solvent ieħor li jkun intwera li ma għandu l-ebda effetti avversi fuq is-sistema tat-test. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xierqa għal

▼M7

konċentrazzjonijiet ta' dilwizzjoni alternattivi. Taħlitiet li fihom aġenti tensjoattivi jistgħu jiġu ttestjati mhux dilwiti jew dilwiti f'konċentrazzjoni xierqa skont ix-xenarju tal-esponiment rilevanti *in vivo*. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xierqa għall-konċentrazzjoni ttestjata. Il-kornei jiġu esposti għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi għal 10 minuti. L-użu ta' ħinijiet oħrajn ta' esponiment għandu jkun ibbażat fuq raġuni xjentifika xierqa. Jekk jogħġbok ara l-Appendiċi 1 għal definizzjoni ta' taħlita tensjoattiva u taħlita li fiha aġent tensjoattiv.

Solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi tipikament jiġu ttestjati bħala soluzzjonijiet jew sospensjonijiet f'konċentrazzjoni ta' 20 % w/v f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0.9 %, ilma distillat, jew solvent ieħor li jkun intwera li ma għandu l-ebda effetti avversi fuq is-sistema tat-test. F'ċerti ċirkostanzi u b'ġustifikazzjoni xjentifika xierqa, is-solidi jistgħu jiġu ttestjati puri b'applikazzjoni diretta fuq is-superfiċje tal-kornea permezz tal-metodu tal-kavità miftuħa (ara l-paragrafu 32). Il-korneji jiġu esposti għas-solidi għal erba' sigħat, iżda bħalma jsir għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi, jistgħu jintużaw ħinijiet ta' esponiment alternattivi fuq il-bażi ta' raġuni xjentifika xierqa.

Jistgħu jintużaw metodi ta' trattament differenti, skont in-natura fiżika u l-karatteristiċi kimiċi (eż. solidi, likwidi, likwidi viskuż jew mhux viskuż) tas-sustanza kimika tat-test. Il-fattur kritiku huwa li jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test tkopri b'mod xieraq is-superfiċje tal-epitelju u li titneħħa b'mod xieraq waqt l-istadji tat-tlaħliħ. Metodu tal-kavità magħluqa tipikament jintuża għal sustanz kimiċi tat-test li jvarjaw minn likwidi mhux viskuż għal likwidi viskuż ftit, filwaqt li metodu tal-kavità miftuħa tipikament jintuża għal sustanzi tat-test li jvarjaw minn likwidi semiviskuż għal likwidi viskuż u għal solidi puri.

Fil-metodu tal-kavità magħluqa, ammont tas-sustanza kimika tat-test (750 µl) li jkun biżżejjed biex ikopri l-kavità anterjuri jiġi introdott minn ġot-toqob tad-dożaġġ fuq is-superfiċje ta' fuq tal-kavità, u t-toqob sussegwentement jiġu ssiġillati bit-tappieri tal-kavità waqt l-esponiment. Huwa importanti li jiġi żgurat li kull kornea tiġi esposta għas-sustanza kimika tat-test għall-intervall tal-ħin xieraq.

Fil-metodu tal-kavità miftuħa, iċ-ċirku li jsakkar it-tieqa u t-tieqa tal-ħġieġ jitneħħew mill-kavità anterjuri qabel ma jibda t-trattament. Il-kontroll jew is-sustanza kimika tat-test (750 µl, jew biżżejjed sustanza kimika tat-test biex tiksi l-kornea għalkollox) jiġu applikati direttament fuq is-superfiċje tal-epitelju tal-kornea permezz ta' mikropipetta. Jekk ikun diffiċli li tuża l-pipetta għas-sustanza kimika tat-test, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi kkargata bil-pressa f'pipetta bi spostament pożittiv sabiex tgħin fid-dożaġġ. Il-ponta tal-pipetta bi spostament pożittiv, tiddaħħal fil-ponta tad-distribuzzjoni tas-siringa sabiex il-materjal ikun jista' jinġibed fil-ponta tal-pipetta taħt pressjoni. Imbagħad jeħtieġ li l-pistun tal-pipetta jinġibed 'il fuq fl-istess waqt li l-pistun tas-siringa jingħafas 'l isfel. Jekk fil-ponta tal-pipetta jiffurmaw xi bżieżaq tal-arja, is-sustanza kimika tat-test għandha titneħħa (tinħareġ 'il barra) u l-proċess jiġi ripetut sa mal-ponta timtela mingħajr ma jkun hemm bżieżaq tal-arja. Jekk ikun meħtieġ, tista' tintuża siringa normali (mingħajr labra) minħabba li din tippermetti l-kejl ta' volum akkurat tas-sustanza kimika tat-test u applikazzjoni eħfef fuq is-superfiċje tal-epitelju tal-kornea. Wara d-dożaġġ, it-tieqa tal-ħġieġ terġa' titqiegħed fuq il-kavità anterjuri biex terġa' tinħoloq sistema magħluqa.

Inkubazzjoni ta' Wara l-Esponiment

Wara l-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test, is-sustanza kimika tal-kontroll negattiv, jew tal-kontroll pożittiv jitneħħew mill-kavità anterjuri u l-epitelju jinħaslu tal-inqas tliet darbiet (jew sakemm ma tkun tista' tiġi osservata l-ebda evidenza viżiva tas-sustanza kimika tat-test) bl-EMEM (li jkun fih il-fenol aħmar). Medium li jkun fih il-fenol aħmar jintuża għat-tlaħliħ minħabba li bidla fil-kulur tal-fenol aħmar tista' tiġi mmonitorjata sabiex tiġi ddeterminata l-effikaċja tat-tlaħliħ ta' sustanzi kimiċi tat-test aċiduż jew alkalini. Il-korneji jinħaslu aktar minn tliet darbiet jekk il-fenol aħmar jibqa' jibdel il-kulur (isfar jew vjola),

▼M7

jew is-sustanza kimika tat-test tkun għadha viżibbli. Ladarba l-medium ma jibqagħlux sustanza kimika tat-test, il-kornei jitlaħalħu għall-aħħar darba bl-EMEM (mingħar fenol aħmar). L-EMEM (mingħajr fenol aħmar) jintuża għall-aħħar tlaħliħa sabiex jiġi żgurat li l-fenol aħmar jitneħħa kompletament mill-kavità anterjuri qabel ma titkejjel l-opaċità. Imbagħad il-kavità anterjuri terġa' timtela b'EMEM frisk mingħajr fenol aħmar.

Għal-likwidi jew l-aġenti tensjoattivi, wara t-tlaħliħ, il-korneji jiġu inkubati għal sagħtejn oħra f'temperatura ta' 32 ± 1 °C. F'ċerti ċirkostanzi ħin itwal ta' inkubazzjoni wara l-esponiment jista' jkun utli u jista' jiġi kkunsidrati fuq bażi ta' każ b'każ. Korneji ttrattati b'solidi jitlaħalħu kompletament fi tmiem il-perjodu tal-esponiment li jdum erba' sigħat, iżda ma jeħtiġux aktar inkubazzjoni.

Fi tmiem il-perjodu ta' inkubazzjoni wara l-esponiment għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi u fi tmiem il-perjodu tal-esponiment ta' erba' sigħat għas-solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi, jiġu rreġistrati l-opaċità u l-permeabilità ta' kull kornea. Barra minn hekk, kull kornea tiġi osservata b'mod viżiv u l-osservazzjonijiet pertinenti jiġu rreġistrati (eż. tqaxxir tat-tessuti, sustanza kimika tat-test residwa, opaċità mhux uniformi). Dawn l-osservazzjonijiet jistgħu jkunu importanti għaliex jistgħu jiġu riflessi minn varjazzjonijiet fil-qari tal-valuri tal-opaċitometru.

Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

Kontrolli negattivi jew tas-solvent/tal-veikolu u kontrolli pożittivi paralleli jiġu inklużi f'kull esperiment.

Meta sustanza likwida tiġi ttestjata f'100 %, kontroll negattiv (eż., soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0.9 % jew ilma distillat) jiġi inkluż fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP sabiex ikunu jistgħu jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test u sabiex tiġi pprovduta linja ta' bażi għall-punti ta' tmiem tal-assaġġ. Dan jiżgura wkoll li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx b'mod li mhux xieraq f'rispons irritanti.

Meta jiġi ttestjat likwidu dilwit, aġent tensjoattiv jew solidu fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP, jiġi inkluż grupp tal-kontroll tas-solvent/tal-veikolu parallel sabiex ikunu jistgħu jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test u sabiex tiġi pprovduta linja ta' bażi għall-punti ta' tmiem tal-assaġġ. Jista' jintuża biss solvent/veikolu li jkun intwera li ma għandu l-ebda effett avvers fuq is-sistema tat-test.

Sustanza kimika magħrufa li tinduċi rispons pożittiv hija inkluża bħala kontroll pożittiv parallel f'kull esperiment sabiex tiġi verifikata l-integrità tas-sistema tat-test u t-twettiq korrett ta' dan. Madankollu, sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tista' tiġi vvalutata, id-daqs tar-reazzjoni irritanti ma għandux ikun eċċessiv.

Eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi kimiċi tat-test likwidi huma 100 % etanol jew 100 % dimetilformamid. Eżempju ta' kontroll pożittiv għal sustanzi kimiċi tat-test huwa 20 % w/v imidażol f'0.9 % soluzzjoni tal-klorur tas-sodju.

Is-sustanzi kimiċi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanzi kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' kimiċi jew tal-prodotti jikkawżaw irritazzjoni okulari, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv li sustanza irritanti għall-għajnejn tikkawża irritazzjoni okulari fi ħdan skala speċifika ta' risponsi ta' sustanzi irritanti.

Punti ta' Tmiem Imkejlin

L-opaċità tiġi stabbilita mill-ammont ta' trażmissjoni ta' dawl minn ġol-kornea. L-opaċità tal-kornea titkejjel b'mod kwantitattiv permezz ta' opaċitometru, li jagħti valuri ta' opaċità fuq skala kontinwa.

Il-permeabilità tiġi stabbilita mill-ammont taż-żebgħa fluworexxeina tas-sodju li tippenetra s-saffi kollha taċ-ċelloli tal-kornea (jiġifieri l-epitelju fuq is-superfiċje esterna tal-kornea għal ġol-endotelju fuq is-superfċije interna tal-kornea). Millilitru ta' soluzzjoni ta' fluworexxeina tas-sodju (4 jew 5 mg/ml meta jiġu ttestjati likwidi jew aġenti tensjoattivi jew solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi, rispettivament) jiżdied fil-kavità anterjuri tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea, li tkun f'kuntatt mal-ġenb epiteljali tal-kornea, filwaqt li l-kavità posterjuri, li tkun f'kuntatt mal-ġenb endoteljali tal-kornea, timtela b'EMEM frisk. Imbagħad l-apparat jiġi inkubat f'pożizzjoni orizzontali għal 90 ± 5 min fi 32 ± 1 °C. L-ammont ta'

▼M7

fluworexxeina tas-sodju li jgħaddi għal ġol-kavità posterjuri jitkejjel b'mod kwantitattiv permezz ta' spettrofotometru UV/VIS. Kejl spettrofotometriku evalwat f'490 nm jiġi rreġistrat bħala densità ottika (OD490) jew valuri ta' assorbità li jitkejlu fuq skala kontinwa. Il-valuri ta' permeabilità tal-fluworexxeina jiġu stabbiliti bl-użu ta' valuri ta' OD490 fuq il-bażi ta' spettrofotometru viżibbli li juża traġitt ottiku standard ta' 1 cm.

Inkella jista' jintuża qarrej tal-folja tal-mikrotitrazzjoni b'96 bwejra diment li; (i) tkun tista' tiġi stabbilita l-iskala ta' valuri lineari tal-qarrej tal-folja għad-determinazzjoni tal-valuri tal-fluworexxeina OD490; u (ii), jintuża l-volum it-tajjeb ta' kampjuni ta' fluworexxeina fil-folja b'96 bir sabiex jinkisbu valuri OD490 ekwivalenti għat-traġitt okulari standard ta' 1 cm (dan jista' jkun jeħtieġ bir sħiħ [normalment 360µl]).

DEJTA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-Dejta

Ladarba l-valuri (OD490) tal-opaċità u l-permeabilità medja jkunu ġew ikkoreġuti għall-opaċità tal-isfond u l-valuri OD490 tal-permeabilità tal-kontroll negattiv, il-valuri medji OD490 tal-opaċità u l-permeabilità għal kull grupp ta' trattament għandhom jiġu kkombinati f'formula dderivata empirikament sabiex jiġi kkalkulat punteġġ tal-irritanza *in vitro* (IVIS) għal kull grupp tat-trattament kif ġej:

IVIS = valur medju tal-opaċità + (15 × valur OD490 medju tal-permeabilità)

Sina *et al*. (16) irrapportaw li din il-formula ġiet idderivata matul studji interni u bejn laboratorji. Id-dejta ġġenerata għal sensiela ta' 36 kompost fi studju fost bosta laboratorji ġiet soġġetta għal analiżi b'varjabbli mutlipli sabiex tiġi ddeterminata l-ekwazzjoni tal-aqwa adattament bejn id-dejta *in vivo* u dik *in vitro*. Ix-xjentisti f'żewġ kumpaniji separati għamlu din l-analiżi u waslu għal ekwazzjonijiet kważi identiċi.

Il-valuri tal-opaċità u tal-permeabilità għandhom jiġu evalwati wkoll b'mod indipendenti sabiex jiġi ddeterminat jekk sustanza kimika tat-test tkunx ipprovokat korrużività jew irritazzjoni severa permezz ta' wieħed biss miż-żewġ punti ta' tmiem (ara l-Kriterji tad-Deċiżjoni).

Kriterji tad-Deċiżjoni

Il-valuri limitu tal-IVIS għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU) u sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU) jingħataw hawnhekk:

IVIS	GHS tan-NU
≤ 3	Ebda Kategorija
> 3; ≤ 55	Ma tista' ssir ebda previżjoni
> 55	Kategorija 1

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tal-Istudju

Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontroll pożittiv jagħti IVIS li jkun fi ħdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika attwali, li tiġi aġġornata tal-anqas kull tliet xhur, jew kull darba li jitwettaq test aċċettabbli f'laboratorji fejn it-testijiet ma jitwettqux b'mod frekwenti (jiġifieri anqas minn darba fix-xahar). Ir-reazzjonijiet mill-kontroll negattiv jew tas-solvent/tal-medium għandhom jirriżultaw f'valuri ta' opaċità u permeabilità li jkunu anqas mill-ogħla limiti stabbiliti għall-valuri tal-opaċità u l-permeabilità tal-isfond għall-korneji bovini ttrattati bil-kontroll negattiv jew tas-solvent/tal-veikolu rispettiv. Sessjoni waħda ta' ttestjar

▼M7

magħmula minn tal-inqas tliet korneji għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni li tirriżulta tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati mhux ċari fl-ewwel sensiela ta' testijiet, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sensiela ta' testijiet (iżda mhux bilfors), kif ukoll it-tielet waħda fil-każ ta' riżultati tal-IVIS medju li ma jaqblux bejn l-ewwel żewġ sensiliet ta' testijiet. F'dan il-kuntest, riżultat fl-ewwel sensiela ta' testijet jitqies li mhuwiex ċar jekk il-previżjonijiet mit-3 korneji ma jkunux jaqblu, b'tali mod li:

— 2 mit-3 korneji taw previżjonijiet li ma jaqblux mill-medja tat-3 korneji kollha kemm huma, JEW,

— 1 mit-3 korneji tat previżjoni li ma taqbilx mill-medja tat-3 korneji kollha kemm huma, U r-riżultat li ma jaqbiżx kien > 10 unitajiet tal-IVIS mil-limitu ta' 55.

— Jekk is-sensiela ripetuta ta' testijiet tikkonferma l-previżjoni tal-ewwel sensiela ta' testijiet (fuq il-bażi tal-valur medju tal-IVIS), tkun tista' tittieħed deċiżjoni finali mingħajr ma jsiru testijiet oħrajn. Jekk is-sensiela ripetuta ta' testijiet fi previżjoni mhux konkordanti mill-ewwel sensiela ta' testijiet (fuq il-bażi tal-valur medju tal-IVIS), issir it-tielet u l-aħħar sensiela ta' testijiet sabiex jiġu solvuti l-previżjonijiet li ma jaqblux, u sabiex tiġi kklassifikata s-sustanza kimika tat-test. Jista' jkun awtorizzat li jiġu rinunzjati iktar testijiet għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar f'każ li xi sensiela ta' testijiet tirriżulta fi previżjoni tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanzi Kimiċi tat-Test u tal-Kontroll

— Isem tas-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) pereżempju l-isem strutturali użat mill-Chemical Abstracts Service (CAS), segwit minn ismijiet oħrajn, jekk ikunu magħrufin; in-Numru tar-Reġistru (RN) tas-CAS, jekk ikun magħruf;

— Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza kimika tat-test/tal-kontroll (f'perċentwal(i) skont il-piż), sakemm din l-informazzjoni tkun disponibbli;

— Proprjetajiet fiżikokimiċi bħall-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, il-klassi kimika, is-solubilità fl-ilma rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

— Trattament tas-sustanzi kimiċi tat-test/ta' kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, tħin);

— L-istabilità, jekk tkun magħrufa.

Informazzjoni dwar l-Isponser u l-Faċilità tat-Test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju.

Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar

— L-opaċitometru użat (eż. mudell u speċifikazzjonijiet) u l-issettjar tal-istrumenti;

— L-informazzjoni dwar il-kalibraġġ għal apparati użati għall-kejl tal-opaċità u l-permeabilità (eż. opaċitometru u spettrofotometru) sabiex tiġi żgurata linearità tal-kejliet;

— It-tip ta' apparati fejn titqiegħed il-kornea użati (eż. mudell u speċifikazzjonijiet);

▼**M7**

— Deskrizzjoni ta' tagħmir ieħor użat;

— Il-proċedura użata sabiex tiġi żgurata l-integrità (jiġifieri l-preċiżjoni u l-affidabilità) tal-metodu ta' ttestjar maż-żmien (eż. ittestjar perjodiku tas-sustanzi kimiċi tal-profiċjenza).

Kriterji għal Test Aċċettabbli

— Il-meded aċċettabbli tal-kontrolli pożittivi u negattivi paralleli bbażati fuq dejta storika;

— Jekk applikabbli, il-meded aċċettabbli tal-kontrolli paralleli ta' riferiment bbażati fuq dejta storika.

Il-Ġbir u l-Preparazzjoni tal-Għajnejn

— Identifikazzjoni tas-sors tal-għajnejn (jiġifieri l-faċilità minn fejn inġabru);

— Id-dijametru tal-kornea bħala kejl tal-età u l-annimal sors u l-idoneità għall-assaġġ;

— Il-kundizzjonijiet tat-trasport u l-ħżin tal-għajnejn (eż., id-data u l-ħin meta nġabru l-għajnejn, l-intervall tal-ħin qabel ma nbeda t-test, il-media tat-trasport u l-kundizzjonijiet tat-temperatura, kwalunkwe antibijotiku li ntuża);

— Il-preparazzjoni u l-immuntar tal-korneji tal-bovini, inklużi dikjarazzjonijiet fuq il-kwalità tagħhom, it-temperatura tal-apparati fejn titqiegħed il-kornea, u l-kriterji għall-għażla tal-korneji użati għall-ittestjar.

Proċedura tat-test

— In-numru ta' repliki użati;

— L-identità tal-kontrolli negattivi u pożittivi użati (jekk applikabbli, anki s-solvent u l-kontrolli ta' riferiment);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza kimika, l-applikazzjoni, il-ħin tal-esponiment u l-ħin ta' inkubazzjoni wara l-esponiment użati;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' deċiżjoni użati.

Ir-riżultati

— Tabulazzjoni ta' dejta minn kampjuni individwali tat-test (eż. valuri ta' opaċità u OD490 u IVIS ikkalkolat għas-sustanza kimika tat-test u l-kontrolli pożittivi, negattivi u ta' riferiment [jekk inklużi], irrapportati f'forma ta' tabella, inkluża dejta minn esperimenti ripetuti ta' replika kif ikun xieraq, u l-medji ± tad-devjazzjoni standard għal kull esperiment);

— Deskrizzjoni ta' effetti osservati oħrajn;

— Il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU *in vitro* derivata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjoni

▼M7

TAGĦRIF

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/-MildMod-TMER.htm.

(3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

(4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Fi: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Fi: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/-MildMod-TMER.htm.

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibbli fuq: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

(17) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/korrużjoni akuta tal-għajnejn.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibbli fuq: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta'"rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika ta' riferiment: Sustanza kimika użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi kimiċi ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufin; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufin, u (v) potenza magħrufa fl-iskala tar-rispons mixtieq.

Approċċ Minn Isfel Għal Fuq: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika ssuspettata li ma teħtieġx klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-għajn li tiksi l-iris u l-pupilla u tħalli d-dawl jgħaddi għal ġol-parti interna tal-għajn.

Opaċità tal-kornea: Kejl tal-estensjoni tal-opaċità tal-kornea wara esponiment għal sustanza kimika tat-test. Żieda fl-opaċità tal-kornea hija indikattiva ta' ħsara fil-kornea. L-opaċità tista' tiġi evalwata b'mod suġġettiv kif isir fit-test Draize li jsir fuq għajnejn il-fniek, jew b'mod oġġettiv bi strument bħal pereżempju "opaċitometru".

Permeabilità tal-kornea: Kejl kwantitattiv tal-ħsara fl-epitelju tal-kornea billi jiġi ddeterminat l-ammont ta' żebgħa fluworexxeina tas-sodju li tgħaddi minn ġos-saffi kollha taċ-ċelluli tal-kornea.

Irritazzjoni għall-għajnejn: Il-produzzjoni ta' tibdiliet fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ ta' wara tal-għajn, li huma kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti reversibbli fuq l-għajnejn" u mal-"Kategorija 2 tal-GHS tan-NU" (4).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' foloz pożittivi: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

Punteġġ tal-Irritazzjoni *In Vitro* (IVIS): Formula dderivata empirikament użata fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP li biha l-valuri medji tal-opaċità u tal-permeabilità għal kull grupp tat-trattament jiġu kkombinati f'punteġġ *in vitro* wieħed għal kull grupp tat-trattament. L-IVIS = valur medju tal-opaċità + (15 x valur medju tal-permeabilità).

Effetti irreversibbli fuq l-għajnejn: Ara "Ħsara serja lill-għajnejn".

▼M7

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreaġixxux (4)

Kontroll negattiv: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Mhux ikklassifikati: Sustanzi kimiċi li mhumiex ikklassifikati għal Irritazzjoni tal-għajnejn (Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU) jew Ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU). Interkambjabbli ma' "Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU".

Opaċitometru: Strument li jintuża sabiex ikejjel "l-opaċità tal-kornea" billi jevalwa b'mod kwantitattiv it-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-kornea. L-istrument tipiku jkollu żewġ kompartimenti, kull wieħed minnhom b'sors ta' dawl u fotoċellola tiegħu stess. Kompartiment minnhom jintuża għall-kornea trattata, filwaqt li l-ieħor jintuża biex jikkalibra u jiżżera l-istrument. Dawl minn lampa aloġena jintbagħat minn ġo kompartiment ta' kontroll (kavità vojta mingħajr twieqi jew likwidu) għal ġo fotoċellola u jitqabbel mad-dawl mingħut minn ġol-kompartiment sperimentali, fejn tinsab il-kavità li fiha l-kornea, għal ġo fotoċellola. Id-differenza fit-trażmissjoni tad-dawl mill-fotoċelloli titqabbel u valur numeriku ta' opaċità jidher fuq displej diġitali.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u ttrattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Effetti irreversibbli fuq l-għajnejn: Ara "Irritazzjoni għall-għajnejn".

Affidabilità: Kejliet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Tiġi vvalutatata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Ħsara serja lill-għajnejn: Il-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-għajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wiċċ quddiemi tal-għajn, li ma jkunux riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti irreversibbli fuq l-għajnejn" u mal-"Kategorija 1 tal-GHS tan-NU" (4).

Kontroll tas-solvent/veikolu: Kampjun mhux ittrattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi pproċessat mal-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi stabbilit ir-rispons baži għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv parallel, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha (4).

▼M7

Tensjoattiv: Imsejjaħ ukoll aġent tensjoattiv, dan huwa sustanza, bħal deterġent, li tista' tnaqqas it-tensjoni fil-wiċċ ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtella' r-ragħwa jew jippenetra solidi; huwa magħruf ukoll bħala aġent li jxarrab.

Taħlita li fiha aġent tensjoattiv: Fil-kuntest ta' dan il-metodu ta' ttestjar, din hija taħlita li fiha aġent tensjoattiv wieħed jew iktar f'konċentrazzjoni finali ta' > 5 %.

Approċċ Minn Fuq Għal Isfel: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika ssuspettata li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu negattiv).

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali: Strateġija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi riveduta, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-ħaddiema tal-emerġenza) u l-ambjent (4).

Kategorija 1 tal-GHS tan-NU: Ara "Ħsara serja lill-għajnejn".

Kategorija 2 tal-GHS tan-NU: Ara "Irritazzjoni għall-għajnejn".

Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU: Sustanzi kimiċi li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU. Interkambjabbli ma' "Mhux Ikklassifikati".

Metodu ta' ttestjar ivvalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar ivvalidat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' preċiżjoni u affidabilità sabiex jitqies aċċettabli għall-għan propost.

Piż tal-evidenza: Il-proċess li fih jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' diversi biċċiet ta' informazzjoni sabiex tintlaħaq u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza kimika li tkun ta' periklu.

▼M7

Appendiċi 2

IL-KAPAĊITÀ TA' PREVIŻJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-BCOP

Tabella 1

Il-Kapaċità ta' Previżjoni tal-BCOP għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn [Kat 1 vs Mhux Kat 1 (Kat 2 + Ebda Kat) tas-CLP tal-UE/ tal-GHS tan-NU; Kat I vs Mhux Kat I (Kat II + KAT III + KAT IV) tal-EPA tal-Istati Uniti]

Klassifikazzjoni Sistema	Nru	Preċiżjoni		Sensittività		Foloz Negattivi		Speċifiċità		Foloz pożittivi	
		%	Nru	%	Nru	%	Nru	%	Nru	%	Nru
GHS tan-NU CLP tal-UE	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
EPA tal-Istati Uniti	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabella 2

Il-Kapaċità ta' Previżjoni tal-BCOP għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn ["mhux irritanti") [Ebda Kat vs Mhux Ebda Kat (Kat 1 + Kat 2) tas-CLP tal-UE/ tal-GHS tan-NU; Kat IV vs Mhux Kat IV (Kat I + Kat II + Kat III) tal-EPA tal-Istati Uniti]

Klassifikazzjoni Sistema	Nru	Preċiżjoni		Sensittività		Foloz Negattivi		Speċifiċità		Foloz pożittivi	
		%	Nru	%	Nru	%	Nru	%	Nru	%	Nru
GHS tan-NU CLP tal-UE	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EPA tal-Istati Uniti	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Appendiċi 3

SUSTANZI KIMIĊI TA' PROFIĊJENZA GĦALL-METODU TA' TTESTJAR TAL-BCOP

Qabel l-użu ta' rutina ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-ħsara lill-għajnejn ta' 13-il sustanza kimika rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħażlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risposti għal perikli tal-għajnejn fuq il-baži tar-riżultati fit-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (TG 405) (17) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Mhux Ikklassifikati) (4). Kriterji tal-għażla oħrajn kienu li s-sustanzi kimiċi huma disponibbli fis-suq, li hemm dejta ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja għad-dispożizzjoni, u li hemm dejta *in vitro* ta' kwalità għolja għad-dispożizzjoni mill-metodu ta' ttestjar tal-BCOP. Hemm dejta ta' referenza disponibbli fid-Dokument Sommarju Simplifikat (3) u fid-Dokument ta' Reviżjoni ta' Sfond tal-ICCVAM għall-metodu ta' ttestjar tal-BCOP (2)(18).

Tabella 1

Is-sustanzi kimiċi rakkomandati għall-wiri tal-profiċjenza teknika bil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP

Sustanza Kimika	CASRN	Sustanza Kimika tal-Klassi ([1])	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni ([2]) *In Vivo*	Klassifikazzjoni tal-BCOP
Klorur tal-benżalkonju (5 %)	8001-54-5	Kompost tal-onju	Likwidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Kloressidin	55-56-1	Ammin, Ammidin	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Dibenzojl-L- aċidu tartariku	2743-38-6	Aċidu karbossiliku, Ester	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Imidażol	288-32-4	Eteroċikliku	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Aċidu trikloroaċetiku (30 %)	76-03-9	Aċidu karbossiliku	Likwidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Klorur ta' 2,6-diklorobenżojl	4659-45-4	Aloġenur tal-aċil	Likwidu	Kategorija 2A	Ma tista' ssir ebda previżjoni preċiża/ affidabbli
Etil-2-metilaċetoaċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2 B	Ma tista' ssir ebda previżjoni preċiża/ affidabbli
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melħ inorganiku	Solidu	Kategorija 2 ([3])	Ma tista' ssir ebda previżjoni preċiża/ affidabbli
EDTA, melħ di-potassju	25102-12-9	Ammin, Aċidu karbossiliku (melħ)	Solidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat
Tween 20	9005-64-5	Ester, Polietere	Likwidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat
2-Merkaptopirimidina	1450-85-7	Aloġenur tal-aċil	Solidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat
Fenilbutażon	50-33-9	Eteroċikliku	Solidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat

▼M7

Sustanza Kimika	CASRN	Sustanza Kimika tal-Klassi ([1])	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni ([2]) *In Vivo*	Klassifikazzjoni tal-BCOP
Poliossietilen 23 lauril eter (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkoħol	Likwidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat

Taqsiriet: CASRN = Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstracts Service

([1]) Klassijiet tas-sustanzzi kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza kimika tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, fuq il-bażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-Librerija Nazzjonali tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi tal-Mediċina (MeSH) (disponibbli fuq http// www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Fuq il-bażi tar-riżultati mit-test in vivo fuq għajnejn il-fniek (OECDTG 405) (17) u bl-użu tal-GHS tan-NU (4).

([3]) Klassifikazzjoni bħala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri 1 minn 3 vs. 2 minn 3 annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji sabiex tiġi ġġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju in vivo kien jinkludi 3 annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-ħmura konġuntivali f'annimal wieħed irkupraw għal punteġġ ta' żero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkuprax għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' ħmura konġuntivali ta' 1 (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 10.

▼M7

Appendiċi 4

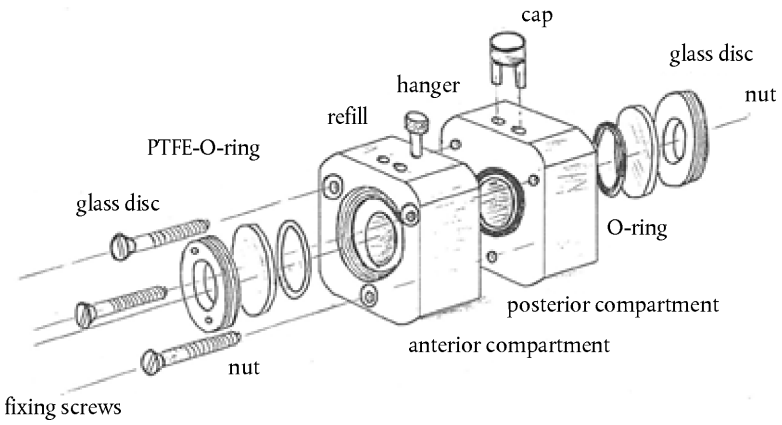
L-APPARAT TAL-BCOP FEJN TITQIEGĦED IL-KORNEA

L-apparat tal-BCOP fejn titqiegħed il-kornea huwa magħmul minn materjal inerti (eż. polipropilen). L-apparat huwa magħmul minn żewġ nofsijiet (kavità anterjuri u oħra posterjuri), u għandu żewġ kavitajiet interni ċilindriċi simili. Kull kavità hija mfassal sabiex tiflaħ volum ta' madwar 5 ml u tintemm f'tieqa tal-ħġieġ, li minnha jiġu rreġistrati l-kejliet tal-opaċità. Kull waħda mill-kavitajiet interni għandha dijametru ta' 1,7 cm u fond ta' 2,2 cm ([1]). Iċ-ċirku-o jitqiegħed fil-kavità posterjuri biex jipprevjeni kwalunkwe tnixxija. Il-korneji jitqiegħdu bil-parti tal-endotelju tħares 'l isfel fuq iċ-ċirku-o tal-kavitajiet posterjuri u l-kavitajiet anterjuri jitqiegħdu fuq il-parti tal-epitelju tal-korneji. Il-kavitajiet jinżammu f'posthom permezz ta' tliet viti tal-azzar inossidabbli li jinsabu fuq it-truf esterni tal-kavità. Fl-aħħar parti ta' kull kavità nsibu tieqa tal-ħġieġ li tista' titneħħa sabiex ikun hemm aċċess faċli għall-kornea. Ċirku-o jitqiegħed ukoll bejn it-tieqa tal-ħġieġ u l-kavità biex jipprevjeni kwalunkwe tnixxija. Żewġ toqbiet fil-parti ta' fuq ta' kull kavità jippermettu l-introduzzjoni u t-tneħħija tal-medium u s-sustanzi kimiċi tat-test. Dawn jingħalqu b'tappijiet tal-lastku waqt il-perjodi ta' trattament u ta' inkubazzjoni. It-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-apparati fejn titqiegħed il-kornea għandha l-potenzjal li tinbidel peress li l-effetti ta' xedd u kedd jew il-ġmigħ ta' residwi kimiċi speċifiċi fit-toqob tal-kavità interna jew fuq it-twieqi tal-ħġieġ jistgħu jaffettwaw it-tifrix jew ir-riflettanza tad-dawl. Il-konsegwenza tista' tkun żidiet jew tnaqqisiet fit-trażmissjoni tad-dawl bażi (u, b'mod kuntrarju, il-valuri tal-opaċità bażi) minn ġol-apparati fejn titqiegħed il-kornea, u tista' tkun evidenti peress li bidliet sinifikanti fil-kejliet inizjali bażi mistennijin tal-opaċità tal-kornea fil-kavitajiet individwali (jiġifieri l-valuri tal-opaċità tal-kornea inizjali f'apparati speċifiċi individwali tal-kornea jistgħu jvarjaw spiss b'iktar minn 2 jew 3 unitajiet tal-opaċità mill-valuri bażi mistennijin). Kull laboratorju għandu jikkunsidra jistabbilixxix programm għall-evalwazzjoni ta' tibdiliet fit-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-apparati fejn titqiegħed il-kornea, skont in-natura tal-kimiki ttestjati u l-frekwenza tal-użu tal-kavitajiet. Sabiex jiġu stabbiliti l-valuri bażi, l-apparati fejn titqiegħed il-kornea jistgħu jiġu vverifikati qabel ma jsir użu ta' rutina billi jitkejlu l-valuri tal-opaċità bażi (jew it-trażmissjoni tad-dawl) tal-kompartimenti b'medium komplut, mingħajr kornei. Imbagħad, l-apparati li jżommu l-korneji jiġu verifikati b'mod perjodiku għal tibdiliet fit-trażmissjoni tad-dawl matul il-perjodi tal-użu. Kull laboratorju jista' jistabbilixxi l-frekwenza għall-verifika tal-apparati fejn titqiegħed il-kornea, fuq il-bażi tas-sustanzi kimiċi ttestjati, il-frekwenza tal-użu, u l-osservazzjonijiet tat-tibdiliet fil-valuri bażi tal-opaċità tal-kornea. Jekk jiġu osservati tibdiliet notevoli fit-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-apparati fejn titqiegħed il-kornea, iridu jiġu kkunsidrati proċeduri xierqa ta' tindif u/jew illostrar tal-wiċċ ta' ġewwa tal-apparati fejn titqiegħed il-kornea jew is-sostituzzjoni ta' dawn.

([1]) Id-dimensjonijiet ipprovduti huma bbażati fuq apparat fejn titqiegħed il-kornea li jintuża għal baqar ta' età li tvarja minn 12-il xahar sa 60 xahar. Fl-eventwalità li jintużaw annimali ta' età minn 6 xhur sa 12-il xahar, l-apparat minflok ikollu jiġi ddisinjat b'tali mod li kull kavità tesa' volum ta' 4 mLl, u kull waħda mill-kavitajiet interni tkun ta' dijametru ta' 1,5 cm u fond ta' 2,2 cm. Fi kwalunkwe apparat iddisinjat ġdid fejn titqiegħed il-kornea, huwa importanti ħafna li l-proporzjon tal-erja tas-superfiċje tal-kornea esposta mal-volum tal-kavità posterjuri ikun daqs il-proporzjon fl-apparat tradizzjonali. Dan huwa meħtieġ sabiex jiġi żgurat li l-valuri tal-permeabilità jiġu ddeterminati b'mod korrett għall-kalkolu tal-IVIS permezz tal-formula proposta

▼M7

Apparat fejn titqiegħed il-kornea: dijagramma bi spjega tal-installazzjoni



▼M7

Appendiċi 5

L-OPAĊITOMETRU

L-opaċitometru huwa apparat li jkejjel it-trażmissjoni tad-dawl. Pereżempju, għal tagħmir OP-KIT minn Electro Design (Riom, Franza) użat fil-validazzjoni tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP, id-dawl minn lampa aloġena jintbagħat minn ġo kompartiment ta' kontroll (kavità vojta mingħajr twieqi jew likwidu) għal ġo fotoċellola u jitqabbel mad-dawl mingħut minn ġol-kompartiment sperimentali, fejn tinsab il-kavità li fiha l-kornea, għal ġo fotoċellola. Id-differenza fit-trażmissjoni tad-dawl mill-fotoċelloli titqabbel u valur numeriku ta' opaċità jidher fuq displej diġitali. L-unitajiet tal-opaċità huma stabbiliti. Jistgħu jintużaw tipi oħrajn ta' opaċitometri b'issettjar differenti (eż. li ma jeħtiġux il-kejliet paralleli tal-kompartimenti tal-kontroll u tal-esperiment) jekk jintwera bil-provi li dawn jagħtu riżultati simili għat-tagħmir ivvalidat.

L-opaċitometru għandu jipprovdi rispons lineari minn skala ta' qari ta' valuri ta' opaċità li jkopru l-valuri tal-limiti użati għal klassifiki differenti deskritti mill-Mudell ta' Tbassir (jiġifieri sal-valur tal-limitu li jindika korrużjoni/irritazzjoni severa). Sabiex jiġi żgurat qari ta' valuri lineari u akkurat sa 75-80 unità ta' opaċità, jeħtieġ li l-opaċitometru jiġi kkalibrat bl-użu ta' sensiela ta' kalibraturi. Il-kalibraturi jitqiegħdu fil-kavità tal-kalibraġġ (kavità tal-kornea mfassla sabiex iżżomm fiha l-kalibraturi) u jinqraw fuq l-opaċitometru. Il-kavità tal-kalibraġġ hija ddisinjata b'tali mod li l-kalibraturi jinżammu bejn wieħed u ieħor fl-istess distanza bejn id-dawl u l-fotoċellola fejn ikunu sejrin jitqiegħdu l-korneji waqt il-kejl tal-opaċità. Il-valuri ta' referenza u l-valur programmat inizjali skont it-tip ta' tagħmir użat. Il-linearità tal-kejliet tal-opaċità għandha tiġi żgurata permezz ta' proċeduri xierqa (speċifiċi għall-istrument). Pereżempju, għat-tagħmir OP-KIT minn Electro Design (Riom, Franza), l-opaċitometru l-ewwel jiġi kkalibrat għal 0 unitajiet tal-opaċità bl-użu tal-kavità tal-kalibraġġ mingħajr kalibratur. Imbagħad tliet kalibraturi differenti jitqiegħdu fil-kavità tal-kalibraġġ wieħed wieħed u jitkejlu l-opaċitajiet. Il-kalibraturi 1, 2 u 3 għandhom jirriżultaw f'qari ta' valuri tal-opaċità daqs il-valuri stabbiliti tagħhom ta' 75, 150, u 225 unità ta' opaċità, rispettivament, ±5 %.

▼M7

B.48. METODU TA' TTESTJAR TAL-GĦAJNEJN TAT-TIĠIEĠ IŻOLATI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' I) SUSTANZI KIMIĊI LI JINDUĊU ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN U II) SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GĦAL IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 438 tal-OECD (2013). Il-metodu ta' ttestjar tal-Għajnejn tat-Tiġieġ Iżolati (ICE) ġie evalwat mill-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interaġenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM), flimkien maċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Ċentru Ġappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM), fl-2006 u l-2010 (1) (2) (3). Fl-ewwel evalwazzjoni, l-ICE ġie approvat bħala metodu ta' ttestjar xjentifikament validu għall-użu bħala test ta' skrinjar sabiex jidentifika sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1), kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) (2) (4) u r-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) ([1]). Fit-tieni evalwazzjoni, il-metodu ta' ttestjar tal-ICE ġie evalwat għall-utilità tiegħu sabiex jidentifika sustanzi kimiċi mhux ikklassifikati għal irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn kif definita mill-GHS tan-NU (3) (4). Ir-riżultati mill-istudju ta' validazzjoni u r-rakkomandazzjonijiet tal-bord ta' evalwazzjoni bejn il-pari żammew ir-rakkomandazzjoni oriġinali għall-użu tal-ICE għall-klassifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU), peress li d-database disponibbli baqgħet l-istess mill-validazzjoni tal-ICCVAM oriġinali. F'dak l-istadju, ma ġiet issuġġerita ebda rakkomandazzjoni ulterjuri għal espansjoni tad-dominju ta' applikabilità tal-ICE sabiex ikunu inklużi kategoriji oħrajn. Saret rievalwazzjoni tas-sett ta' dejta *in vitro* u *in vivo* użat fl-istudju ta' validazzjoni b'enfasi fuq l-evalwazzjoni tal-utilità tal-ICE sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn (5). Din ir-rievalwazzjoni kkonkludiet li l-metodu ta' ttestjar tal-ICE jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn u ħsara serja lill-għajnejn kif definita mill-GHS tan-NU (4) (5). Dan il-metodu ta' ttestjar jinkludi l-użi rakkomandat u l-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE fuq il-bażi ta' dawn l-evalwazzjonijiet. Id-differenzi ewlenin bejn il-verżjoni oriġinali tal-2009 u l-verżjoni aġġornata tal-2013 tal-linja gwida tat-test tal-OECD jinkludu, iżda mhumiex limitati għal: l-użu tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni skont is-Sistema ta' Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU, aġġornament fl-elementi tar-rapport tat-test, aġġornament tal-Appendiċi 1 dwar id-definizzjonijiet, u aġġornament tal-Appendiċi 2 dwar is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza.

Ġeneralment huwa aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test *in vitro* tal-irritazzjoni tal-għajnejn waħdu ma huwa sejjer ikun kapaċi jieħu post it-test Draize *in vivo* tal-għajnejn sabiex ibassar il-medda sħiħa ta' irritazzjonijiet għal klassijiet ta' sustanzi kimiċi differenti. Madankollu, taħlitiet strateġiċi ta' diversi metodi ta' ttestjar alternattivi fi ħdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu kapaċi jieħdu post it-test Draize tal-għajnejn (6). L-approċċ minn Fuq għal Isfel (7) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija li jkollha potenzjal għoli ta' irritazzjoni, filwaqt li l-approċċ minn Isfel għal Fuq (7) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika ma tkunx mistennija tikkaġuna biżżejjed irritazzjoni tal-għajnejn sabiex tkun teħtieġ li tiġi kklassifikata. Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti

([1]) Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1

▼M7

ċirkustanzi u fi ħdan limitazzjonijiet speċifiċi kif deskritti fil-paragrafi 8 sa 10 għall-klassifikazzjoni tal-periklu għall-għajnejn u t-tikkettar ta' sustanzi kimiċi. Filwaqt li ma jitqiesx li huwa validu bħala sostitut awtonomu għat-test *in vivo* tal-għajnejn fuq il-fniek, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa rakkomandat bħala pass inizjali fi ħdan strateġija ta' ttestjar, bħall-approċċ minn Fuq għal Isfel issuġġerit minn Scott *et al*. (7) sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn, jiġifieri sustanzi kimiċi li jiġu klassifikati fil-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, mingħajr ma jsiru iktar testijiet (4). Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE huwa rakkomandat ukoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, kif definiti mill-GHS tan-NU (Ebda Kategorija, NC) (4) u għalhekk jista' jintuża bħala l-ewwel pass fi ħdan approċċ ta' strateġija ta' ttestjar minn Isfel għal Fuq (7). Madankollu, sustanza kimika li mhijiex prevista li tikkaġuna ħsara serja lill-għajnejn jew bħala mhux klassifikata għal irritazzjoni tal-għajnejn/ħsara serja lill-għajnejn bil-metodu ta' ttestjar tal-ICE tkun teħtieġ iktar testijiet (*in vitro* u/jew *in vivo*) sabiex tistabbilixxi klassifikazzjoni definittiva. Barra minn hekk, għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel ma l-ICE jintuża f'approċċ minn isfel għal fuq skont skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn li mhumiex il-GHS tan-NU.

L-għan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-għajen kif imkejjel mill-ħila tagħha li tinduċi jew le tossiċità f'għajn enukleata ta' tiġieġa. Effetti tossiċi għall-kornea jitkejlu permezz ta' (i) valutazzjoni kwalitattiva tal-opaċità, (ii) valutazzjoni kwalitattiva tal-ħsara għall-epitelju fuq il-bażi tal-applikazzjoni tal-fluworexxeina fl-għajn (żamma tal-fluworexxeina), (iii) kejl kwantitattiv ta' żieda fil-ħxuna (nefħa), u (iv) evalwazzjoni kwalitattiva ta' ħsara morfoloġika makroskopika fis-superfiċje. Il-valutazzjonijiet tal-opaċità, tan-nefħa, u tal-ħsara fil-kornea wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test jiġu vvalutati b'mod individwali u jiġu kkombinati sabiex tiġi dderivata Klassifikazzjoni tal-Irritazzjoni tal-Għajnejn.

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll issuġġerit fid-Dokument ta' Gwida 160 tal-OECD (8), li ġie żviluppat b'segwitu għal studju ta' validazzjoni internazzjonali tal-ICCVAM (1) (3) (9), b'kontribuzzjonijiet mingħand iċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Ċentru Ġappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi, u d-Dipartiment tat-Tossikoloġija u l-Farmakoloġija Applikata tat-TNO Kwalità tal-Ħajja (in-Netherlands). Il-protokoll huwa bbażat fuq informazzjoni miksuba minn protokolli ppubblikati, kif ukoll il-protokoll attwali użat mit-TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Saru testijiet fuq firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi fil-validazzjoni li hija l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar u d-database empirika tal-istudju ta' validazzjoni rriżultaw f'152 sustanza kimika inklużi 72 sustanza u 80 taħlita (5). Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għal solidi, likwidi, emulsjonijiet u ġellijiet. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx eżaminati fi studju ta' validazzjoni.

Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE jista' jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn, jiġifieri sustanzi kimiċi li jiġu klassifikati taħt il-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU (4). Meta jintużaw għal dan il-għan, il-limitazzjonijiet identifikati għall-metodu ta' ttestjar tal-ICE huma bbażati fuq ir-rati għoljin ta' foloz pożittivi għal alkoħols u r-rati għoljin ta' foloz negattivi għal solidi u aġenti tensjoattivi (1) (3) (9). Barra minn hekk, f'dan il-kuntest ir-rati ta' foloz negattivi (tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU identifikati li mhumiex tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU) mhumiex kritiċi peress li s-sustanzi kimiċi kollha tat-test li jiġu negattivi mbagħad jiġu ttestjati b'test(ijiet) *in vitro* vvalidat b'mod adegwat ieħor, jew bħala l-aħħar alternattiva, fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ tal-piż tal-evidenza. Ta'

▼M7

min jinnota li s-solidi jistgħu jwasslu għal kundizzjonijiet varjabbli u ta' esponiment estrem fit-test Draize *in vivo* tal-irritazzjoni tal-għajnejn, li jitsgħu jirriżultaw fi previżjonijiet irrilevanti tal-potenzjal ta' irritazzjoni veru tagħhom (15). L-investigaturi għandhom jikkunsidraw jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, f'liema każ riżultat pożittiv għandu jiġi aċċettat bħala indikatur ta' ħsara serja lill-għajnejn, jiġifieri klassifikazzjoni bħala tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU mingħajr ma jsiru iktar testijiet. Madankollu, riżultati pożittivi miksuba bl-alkoħols għandhom jiġu interpretati b'ċerta kawtela minħabba r-riskju ta' tbassir eċċessiv.

Meta jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU), il-metodu ta' ttestjar tal-ICE għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 86 % (120/140), rata ta' foloz pożittivi ta' 6 % (7/113) u rata ta' foloz negattivi ta' 48 % (13/27) meta mqabbel mad-dejta tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* fuq għajnejn il-fniek ikklassifikat skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4) (5).

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4). Għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel ma l-ICE jintuża f'approċċ minn isfel għal fuq skont skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, fejn riżultat negattiv jista' jiġi aċċettat għan-nuqqas ta' klassifikazzjoni ta' sustanza kimika għal irritazzjoni tal-għajnejn u ħsara serja lill-għajnejn. Madankollu, fuq il-bażi ta' riżultat wieħed mid-database tal-validazzjoni, żebgħa antifouling li fiha solvent organiku tista' tkun sottovalutata fil-previżjonijiet (5).

Meta jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn u ħsara serja lill-għajnejn, il-metodu ta' ttestjar tal-ICE għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 82 % (125/152), rata ta' foloz pożittivi ta' 33 % (26/79) u rata ta' foloz negattivi ta' 1 % (1/73) meta mqabbel mad-dejta tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* fuq għajnejn il-fniek ikklassifikat skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4) (5). Meta s-sustanzi kimiċi tat-test fi ħdan ċerti klassijiet (jiġifieri antifouling żebgħat li fiha solvent organiku) jiġu eskluży mid-database, il-preċiżjoni tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE hija ta' 83 % (123/149), ir-rata ta' foloz pożittivi 33 % (26/78), u r-rata ta' foloz negattivi ta' 0 % (0/71) għas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4) (5).

Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE mhuwiex rakkomandat għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jiġu klassifikati bħala irritanti għall-għajnejn (jiġifieri Kategorija 2 jew Kategorija 2A tal-GHS tan-NU) jew sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jiġu klassifikati bħala ftit irritanti għall-għajnejn (Kategorija 2B tal-GHS tan-NU) minħabba n-numru konsiderevoli ta' sustanzi kimiċi tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU bħala sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU u ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU sovraklassifikati bħala Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU. Għal dan il-għan, jista' jkun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet b'metodu xieraq ieħor.

Il-proċeduri kollha li jinvolvu għajnejn tat-tiġieġ għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri applikabbli tal-istallazzjoni tal-ittestjar f'dak li għandu x'jaqsam mal-manipulazzjoni ta' materjali derivati mill-bnedmin jew l-annimali, li jinkludu, iżda li mhumiex limitati għal, tessuti u fluwidi tat-tessuti. Huwa rakkomandat li jittieħdu l-prekawzjonijiet universali tal-laboratorju (16).

Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-ICE ma jqisx feriti konġuntivali u iridali kif evalwati fil-metodu ta' ttestjar tal-irritazzjoni okulari fil-fniek, dan jindirizza l-effetti korneali, li huma kawża primarja tal-klassifikazzjoni *in vivo* meta titqies il-Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU. Barra dan, għalkemm ir-reversibilità tal-feriti fil-kornea ma tistax tiġi evalwata *per se* fil-metodu ta' ttestjar tal-ICE, ġie propost, fuq il-bażi ta' studji fuq għajnejn il-fniek, li valutazzjoni tal-fond inizjali

▼M7

tal-ferita fil-kornea tista' tintuża sabiex jiġu identifikati uħud mit-tipi ta' effetti irreversibbli (17). B'mod partikolari, hemm bżonn ta' iktar għarfien xjentifiku sabiex nifhmu kif iseħħu effetti irreversibbli mhux marbtin ma' ferita inizjali ta' livell għoli. Fl-aħħar nett, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ma jippermettix li ssir valutazzjoni tal-potenzjal għal tossiċità sistemika assoċjata ma' esponiment okulari.

Dan il-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi aġġornat kull ċertu żmien iktar ma jkun hemm informazzjoni u dejta ġodda kkunsidrati. Pereżempju, l-istopatoloġija tista' tkun potenzjalment siewja meta jkun hemm bżonn ta' karatterizzazzjoni iktar kompluta tal-ħsara fil-kornea. Sabiex jevalwaw din il-possibbiltà, dawk li jużawh huma mħeġġin jippreservaw l-għajnejn u jħejju kampjuni għall-istopatoloġija li jistgħu jintużaw sabiex jiġu żviluppati database u kriterji dwar id-deċiżjonijiet li jistgħu jkomplu jtejbu l-preċiżjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar. L-OECD żviluppat Dokument ta' Gwida dwar l-użu ta' metodi ta' ttestjar tat-tossiċità okulari *in vitro*, li jinkludi proċeduri dettaljati dwar il-ġbir ta' kampjuni tal-istopatoloġija u informazzjoni dwar fejn għandhom tiġi sottomessa dejta dwar il-kampjuni u/jew l-istopatoloġija (8).

Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment ikun qiegħed jistabbilixxi dan l-assaġġ, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 2. Laboratorju jista' juża dawn is-sustanzi kimiċi sabiex juri l-kompetenza teknika tiegħu fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE qabel ma jissottometti dejta tal-ICE għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE huwa mudell organotipiku li jipprovdi manutenzjoni fuq terminu ta' żmien qasir fuq għajnejn it-tiġieġ *in vitro*. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-ħsara mis-sustanza kimika tat-test tiġi vvalutata bid-determinazzjoni tan-neħa, l-opaċità u ż-żamma tal-fluworexxeina fil-kornea. Filwaqt li l-aħħar żewġ parametri jinvolvu valutazzjoni kwalitattiva, analiżi tan-neħa fil-kornea tipprovdi valutazzjoni kwantitattiva. Kull kejl jiġi kkonvertit f'punteġġ kwantitattiv użat għall-kalkolu ta' Indiċi tal-Irritazzjoni Kumplessiv, jew inkella jiġi assenjat kategorizzazzjoni kwalitattiva li tintuża sabiex tiġi assenjata klassifikazzjoni tal-periklu okulari *in vitro*, jew bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU jew bħala mhux klassifikat fil-GHS tan-NU. Imbagħad jista' jintuża wieħed minn dawn l-eżiti sabiex jitbassar il-potenzjal ta' ħsara serja lill-għajnejn *in vivo* jew ebda rekwiżit għall-klassifikazzjoni ta' periklu għall-għajnejn ta' sustanza kimika tat-test (ara l-Kriterji tad-Deċiżjoni). Madankollu, ma tista' tingħata ebda klassifikazzjoni għal sustanzi kimiċi li mhumiex previsti li jikkaġunaw ħsara serja lill-għajnejn jew li mhumiex ikklassifikati bil-metodu ta' ttestjar tal-ICE (ara l-paragrafu 11).

Sors u Età ta' Għajnejn it-Tiġieġ

Storikament, għal dan l-assaġġ intużaw għajnejn li jkunu ttieħdu mit-tiġieġ minn biċċerija fejn jinqatlu għall-konsum mill-bniedem, u b'hekk ġiet eliminata l-ħtieġa ta' annimali tal-laboratorju. Jintużaw biss għajnejn ta' annimali b'saħħithom li huma xierqa sabiex jidħlu fil-katina alimentari tal-bniedem.

Għalkemm ma twettaq l-ebda studju kontrollat għall-valutazzjoni tal-età ideali tat-tiġieġ, l-età u l-piż tat-tiġieġ użati storikament f'dan il-metodu ta' ttestjar huma dawk ta' tiġieġ tar-rebbiegħa li tradizzjonalment jiġu pproċessati minn biċċerija tat-tjur (jiġifieri bejn wieħed u ieħor ta' età ta' 7 ġimgħat, u piż ta' 1.5 — 2.5 kg).

Ġbir u Trasport tal-Għajnejn lejn il-Laboratorju

L-irjus għandhom jitneħħew immedjatament wara s-sedazzjoni tat-tiġieġ, ġeneralment b'xokk elettriku u inċiżjoni tal-għonq għall-fsada. Għandu jiġi lokalizzat sors lokali ta' tiġieġ qrib il-laboratorju sabiex l-irjus tat-tiġieġ jiġu ttrasferiti mill-biċċerija sal-laboratorju malajr biżżejjed sabiex kemm jista' jkun jonqos/-tonqos id-deterjorament u/jew il-kontaminazzjoni mill-batterji. L-intervall tal-ħin li jgħaddi minn meta jinġabru l-irjus tat-tiġieġ u t-tqegħid tal-għajnejn fil-kavità tas-superfużjoni wara l-enuklerazzjoni għandu jitnaqqas kemm jista' jkun (normalment fi żmien sagħtejn) sabiex jiġi żgurat li jintlaħqu l-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-assaġġ. L-għajnejn kollha użati fl-assaġġ għandhom ikunu mill-istess grupp ta' għajnejn miġbura f'ġurnata speċifika.

▼M7

Minħabba l-fatt li l-għajnejn jiġu ddissektjati fil-laboratorju, l-irjus intatti jiġu ttrasportati mill-biċċerija f'temperatura ambjentali (normalment bejn 18 °C u 25 °C) f'kaxex tal-plastik umdifikati b'karti mxarrba b'soluzzjoni iżotonika ta' ilma bil-melħ.

Il-Kriterji tal-Għażla u n-Numru ta' Għajnejn Użati fl-ICE

Għajnejn li jkollhom punteġġ għoli ta' tilwin bil-fluworexxeina (jiġifieri > 0.5) jew punteġġ għoli ta' opaċità fil-kornea (jiġifieri > 0.5) wara li jitneħħew mill-ħofra tal-għajn jitwarrbu.

Kull grupp tat-trattament u tal-kontroll pożittiv parallel jikkonsisti minn tal-anqas tliet għajnejn. Il-grupp tal-kontrolli negattivi jew il-kontroll tas-solvent (jekk jintuża solvent li ma jkunx salina) jikkonsisti minn tal-anqas għajn waħda.

Fil-każ ta' materjali solidi li jwasslu għal eżitu ta' NC tal-GHS, huwa rakkomandat li tintuża t-tieni sensiela ta' tliet għajnejn sabiex jiġi kkonfermat jew miċħud ir-riżultat negattiv.

PROĊEDURA

Preparazzjoni tal-Għajnejn

Il-kappell tal-għajn jinqata' barra b'ħafna attenzjoni sabiex ma ssir l-ebda ħsara fil-kornea. L-integrità tal-kornea tiġi vvalutata malajr b'qatra fluworexxeina tas-sodju 2 % (w/v) li tiġi applikata fuq is-superfiċje tal-kornea għal ftit sekondi, u mbagħad titlaħlaħ b'salina iżotonika. Imbagħad l-għajnejn ittrattati bil-fluworexxeina jiġu eżaminati b'mikroskopju korneali sabiex jiġi żgurat li l-kornea ma jkollha l-ebda ħsara (jiġifieri punteġġi taż-żamma tal-fluworexxeina u tal-opaċità tal-kornea ≤ 0.5).

Jekk l-għajn ma jkollha l-ebda ħsara, tinqata' mill-kranju b'attenzjoni kbira sabiex ma ssir l-ebda ħsara lill-kornea. Il-boċċa tal-għajn tinġibed mill-orbita billi wieħed iżomm sod il-membrana nittitanti b'forċipi kirurġiċi, u l-muskoli tal-għajn jinqatgħu b'imqass mgħawweġ u b'ponta spuntata. Huwa importanti li wieħed jevita li jikkawża ħsara fil-kornea minħabba pressjoni eċċessiva (jiġifieri artefatti ta' kompressjoni.)

Meta l-għajn titneħħa mill-orbita, porzjon viżibbli tan-nerv ottiku għandu jibqa' mwaħħal. Ladarba titneħħa mill-orbita, l-għajn titqiegħed fuq kuttunar assorbenti u l-membrana nittitanti u tessut konnettiv ieħor jinqatgħu.

L-għajn imneħħija mill-ħofra tagħha titqiegħed fuq klamp tal-azzar inossidabbli b'tali mod li l-kornea tkun f'pożizzjoni vertikali. Imbagħad il-klamp jiġi ttrasferit f'kavità fl-apparat tas-superfużjoni (18). Il-klampijiet għandhom jitqiegħdu fl-apparat tas-superfużjoni b'tali mod li l-kornea sħiħa tiġi fornita bid-drip salina iżotonika (3-4 taqtiriet fil-minuta jew 0.1 sa 0.15 ml/min). Il-kavitajiet tal-apparat tas-superfużjoni għandu jkollhom temperatura kkontrollata ta' 32 ± 1.5 °C. L-Appendiċi 3 jipprovdi dijagramma ta' apparat tipiku tas-superfużjoni u l-klampijiet tal-għajnejn, li jistgħu jinxtraw jew jinbnew. L-apparat jista' jitbiddel sabiex jissodisfa l-ħtiġijiet ta' laboratorju individwali (eż. biex jakkomoda għadd differenti ta' għajnejn).

Wara li jitqiegħdu fl-apparat tas-superfużjoni, l-għajnejn jerġgħu jiġu eżaminati b'mikroskopju tal-kornea sabiex jiġi żgurat li ma tkun saritilhom l-ebda ħsara waqt il-proċedura tad-dissezzjoni. Il-ħxuna tal-kornea fil-quċċata tal-kornea għandha titkejjel ukoll issa bl-użu tal-apparat li jkejjel il-fond fuq il-mikroskopju korneali. Għajnejn b'; (i) punteġġ ta' żamma ta' fluworexxeina ta' > 0.5; (ii) opaċità korneali > 0,5; jew, (iii), kwalunkwe sinjal addizzjonali ta' ħsara għandhom jiġu ssostitwiti. Għal għajnejn li ma jintremewx fuq il-bażi ta' kwalunkwe wieħed minn dawn il-kriterji, għajnejn individwali bi ħxuna tal-kornea li tiddevja b'aktar minn 10 % mill-valur medju għall-għajnejn kollha għandhom jintremew. L-utenti għandhom ikunu konxji li l-mikroskopji korneali jistgħu jagħtu kejl differenti tal-ħxuna tal-kornea jekk l-issettjar tal-wisgħa tal-feṫa jkun differenti. Il-wisgħa tal-feṫa għandha tkun stabbilita għal 0,095 mm.

▼M7

Ladarba l-għajnejn kollha jiġu eżaminati u approvati, l-għajnejn jiġu inkubati għal madwar 45 sa 60 minuta sabiex jiġu ekwilibrati mas-sistema tat-test qabel id-dożaġġ. Wara l-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, jiġi rreġistrat il-punt żero ta' referenza għall-ħxuna u l-opaċità tal-kornea sabiex iservi bħala bażi (jiġifieri ħin = 0). Il-punteġġ tal-fluworexxeina ddeterminat fid-dissezzjoni jintuża bħala l-ewwel kejl għal dak il-punt ta' tmiem.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Eżatt wara l-kejl tal-punt żero ta' referenza, l-għajn (fl-apparat fejn titqiegħed) titneħħa mill-apparat tas-superfużjoni, titqiegħed f'pożizzjoni orizzontali, u s-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq il-kornea.

Sustanzi kimiċi tat-test likwidi tipikament jiġu ttestjati mhux iddilwiti, iżda jistgħu jiġu ddilwiti jekk dan jitqies neċessarju (eż. bħala parti mit-tfassil tal-istudju). Is-solvent preferut għas-sustanzi kimiċi tat-test dilwiti huwa s-salina fiżjoloġika. Madankollu, jistgħu jintużaw solventi alternattivi ukoll f'kundizzjonijiet ikkontrollati, iżda għandu jintwera li dawn ikunu solventi xierqa biex jintużaw minflok is-salina fiżjoloġika.

Sustanzi kimiċi tat-test likwidi jiġu applikati fuq il-kornea b'tali mod li s-superfiċje sħiħa tal-kornea tkun miksija b'mod indaqs bis-sustanza kimika tat-test; il-volum standard huwa ta' 0.03 ml.

Jekk possibbli, is-sustanzi kimiċi tat-test solidi għandhom jintaħnu f'mehrież u lida, sa ma jkunu kemm jista' jkun fini, jew f'għodda tat-tħin komparabbli. It-trab jiġi applikat fuq il-kornea b'tali mod li l-kornea tkun miksija b'mod uniformi bis-sustanza kimika tat-test; l-ammont standard huwa ta' 0.03 gm.

Is-sustanza kimika tat-test (likwida jew solida) tiġi applikata għal 10 sekondi u mbagħad titlaħlaħ minn fuq l-għajn bis-salina iżotonika (madwar 20 ml) f'temperatura ambjentali. Imbagħad l-għajn (fl-apparat fejn titqiegħed) terġa' titqiegħed fl-apparat tas-superfużjoni fil-pożizzjoni wieqfa oriġinali. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jsir iktar tlaħliħ wara l-applikazzjoni ta' 10 sek u f'punti ta' żmien sussegwenti (eż. jekk jinstabu residwi ta' sustanza kimika tat-test fuq il-kornea). B'mod ġenerali, l-ammont ta' salina li tintuża b'mod addizzjonali għat-tlaħliħ mhuwiex kritiku, iżda l-osservazzjoni tal-aderenza tas-sustanza kimika mal-kornea hija importanti.

Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

Kontrolli negattivi jew tas-solvent/veikolu paralleli u kontrolli pożittivi għandhom jiġu inklużi f'kull esperiment.

Meta jkunu qegħdin jiġu ttestjati likwidi f'100 % jew solidi, tintuża salina fiżjoloġika bħala l-kontroll negattiv parallel fil-metodu ta' ttestjar tal-ICE sabiex jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test, u sabiex jiġi żgurat li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx bla bżonn f'rispons irritanti.

Meta jkunu qegħdin jiġu ttestjati likwidi ddilwiti, fil-metodu ta' ttestjar tal-ICE jiġi inkluż grupp ta' kontrolli tas-solvent/veikolu parallel sabiex jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test, u sabiex jiġi żgurat li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx bla bżonn f'rispons irritanti. Skont il-paragrafu 31, jista' jintuża biss solvent/veikolu li jkun intwera li ma jkollu l-ebda effett avvers fuq is-sistema tat-test.

F'kull esperiment jiġi inkluż irritant għall-għajnejn magħruf sabiex jiġi vverifikat li jkun ġie kkawżat rispons xieraq. Minħabba li l-assaġġ ICE qed jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jidentifika sustanzi kimiċi korrużivi jew irritanti severi, il-kontroll pożittiv għandu jkun sustanza ta' referenza li tikkawża rispons sever f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons sever ma

▼M7

għandux ikun eċċessiv. Għandha tiġi ġġenerata biżżejjed dejta in vitro għall-kontroll pożittiv sabiex għall-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi kkalkolata skala ta' valuri ddefiniti statistikament li tkun aċċettabbli. Jekk ma jkunx hemm disponibbli dejta storika xierqa tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE għal kontroll pożittiv partikolari, jista' jkun meħtieġ li jsiru studji li jipprovdu din l-informazzjoni.

Eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi kimiċi tat-test likwidi huma l-aċidu aċetiku 10 % jew il-klorur tal-benżalkonju 5 %, filwaqt li eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi kimiċi tat-test solidi huma l-idrossidu tas-sodju jew l-imidażol.

Is-sustanzi kimiċi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanzi kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' kimiċi jew tal-prodotti jikkawżaw irritazzjoni okulari, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv li sustanza irritanti għall-għajnejn tikkawża irritazzjoni okulari fi ħdan skala speċifika ta' risponsi ta' sustanzi irritanti.

Punti ta' Tmiem Imkejlin

Il-korneji ttrattati jiġu evalwati qabel it-trattament u mbagħad fit-30, fil-75, fil-120, fil-180 u fil-240 minuta (± 5 minuti) wara t-tlaħliħa ta' wara t-trattament. Dawn il-punti tal-ħin jipprovdu għadd xieraq ta' kejl tul il-perjodu tat-trattament ta' erba' sigħat, filwaqt li jħallu biżżejjed ħin jgħaddi bejn kejl u ieħor sabiex isiru l-osservazzjonijiet neċessarji li għandhom isiru għall-għajnejn kollha.

Il-punti ta' tmiem evalwati għall-opaċità, in-nefħa, iż-żamma tal-fluworexxeina fil-kornea u l-effetti morfoloġiċi (eż. tħaffir jew illaxkar tal-epitelju). Il-punti ta' tmiem kollha, bl-eċċezzjoni taż-żamma tal-fluworexxeina (li tiġi ddeterminata biss qabel it-trattament u 30 minuta wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test) jiġu ddeterminati f'kull wieħed mill-punti tal-ħin imsemmija hawn fuq.

It-teħid ta' ritratti huwa rrakkomandat għad-dokumentazzjoni tal-opaċità, iż-żamma tal-fluworexxeina, l-effetti morfoloġiċi fil-kornea u, jekk issir, l-istopatoloġija.

Wara l-eżami finali wara erba' sigħat, l-utenti huma mħeġġin jippreservaw l-għajnejn f'fissativ xieraq (eż. formalina bbaferjata newtrali) għal eżami istopatoloġiku possibbli (ara l-paragrafu 14 u r-referenza (8) għal iktar dettalji).

In-nefħa fil-kornea tiġi ddeterminata mill-kejl tal-ħxuna fil-kornea li jsir permezz ta' pakimetru ottiku fuq mikroskopju korneali. In-nefħa tiġi espressa bħala perċentwal u tiġi kkalkolata mill-kejl tal-ħxuna tal-kornea skont il-formula li ġejja:

$$\left(\frac{corneal\ thickness\ at\ time\ t - corneal\ thickness\ at\ time = 0}{corneal\ thickness\ at\ time = 0} \right) \times 100$$

Il-perċentwal medju tan-nefħa fil-kornea għat-testijiet kollha tal-għajnejn jiġi kkalkolat għall-punti tal-ħin ta' osservazzjoni kollha. Fuq il-bażi tal-ogħla punteġġ medju għan-nefħa fil-kornea, kif jiġi osservat fi kwalunkwe punt tal-ħin, jingħata punteġġ tal-kategorija għal kull sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 51).

L-opaċità korneali tiġi evalwata billi tintuża l-iktar parti tal-kornea opaċifikata b'densità għall-punteġġar kif muri fit-Tabella 1. Il-valur medju tal-opaċità fil-kornea għat-testijiet kollha tal-għajnejn jiġi kkalkolat għall-punti tal-ħin ta' osservazzjoni kollha. Fuq il-bażi tal-ogħla punteġġ medju għall-opaċità fil-kornea, kif jiġi osservat fi kwalunkwe punt tal-ħin, jingħata punteġġ tal-kategorija għal kull sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 51).

▼M7

Tabella 1

Punteġġi tal-opaċità tal-kornea.

Punteġġ	Osservazzjoni
0	L-ebda opaċità
0.5	Opaċità ħafifa ħafna
1	Żoni mifruxin jew diffużi; id-dettalji tal-iris jidhru b'mod ċar
2	Parti traslużida li tintlemaħ faċilment; id-dettalji tal-iris huma kemxejn oskuri
3	Opaċità severa fil-kornea; ma jidher l-ebda dettall speċifiku tal-iris; id-daqs tal-pupilla bilkemm jintlemaħ
4	Opaċità totali fil-kornea; iris inviżibbli

Iż-żamma tal-fluworexxeina tiġi evalwata fil-punt tal-ħin ta' osservazzjoni ta' 30 minuta biss kif muri fit-Tabella 2. Il-valur medju taż-żamma tal-fluworexxeina għall-għajnejn kollha tat-test jiġi kkalkolat għall-punt tal-ħin osservat ta' 30 minuta, u jintuża għall-punteġġ kumplessiv tal-kategorija għal kull sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 51).

Tabella 2

Punteġġi taż-żamma tal-fluworexxeina.

Punteġġ	Osservazzjoni
0	L-ebda żamma ta' fluworexxeina
0,5	Tilwin batut ħafna ta' ċelloli individwali
1	Tilwin taċ-ċelloli individwali mifrux fil-parti ttrattata kollha tal-kornea
2	Tilwin ta' ċelloli individwali dens fokali jew konfluwenti
3	Partijiet kbar konfluenti tal-kornea jżommu l-fluworexxeina

Effetti morfoloġiċi inkluż "tħaffir" taċ-ċelloli tal-epitelju tal-kornea, "illaxkar" tal-epitelju, "taħrix" tas-superfiċje tal-kornea u "twaħħi" tas-sustanza kimika tat-test mal-kornea. Dawn is-sejbiet jistgħu jvarjaw fis-severità u jistgħu iseħħu b'mod simultanju. Il-klassifikazzjoni ta' dawn is-sejbiet hija soġġettiva skont l-interpretazzjoni tal-investigatur.

DEJTA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-Dejta

Ir-riżultati tal-opaċità, in-nefħa, u ż-żamma tal-fluworexxeina fil-kornea għandhom jiġu evalwati b'mod separat sabiex tinħoloq klassi separata għal kull punt ta' tmiem. Imbagħad il-klassijiet tal-ICE għal kull punt ta' tmiem jiġu kkombinati sabiex tinħoloq Klassifikazzjoni tal-Irritazzjoni għal kull sustanza kimika tat-test.

Kriterji tad-Deċiżjoni

Ladarba jkun ġie evalwat kull punt ta' tmiem, il-klassijiet tal-ICE jistgħu jiġu assenjati fuq il-bażi ta' skala ta' valuri ddeterminata minn qabel. L-interpretazzjoni tan-nefħa tal-kornea (it-Tabella 3), l-opaċità (it-Tabella 4), u ż-żamma tal-fluworexxeina (it-Tabella 5) bl-użu ta' erba' klassijiet tal-ICE ssir skont l-iskali murijin hawn taħt. Ta' min jinnota li l-punteġġi tan-nefħa tal-kornea murija fit-Tabella 3 huma

▼M7

applikabbli biss jekk il-ħxuna titkejjel b'mikroskopju korneali (pereżempju Haag-Streit BP900) b'apparat tal-kejl tal-fond Nru 1 u ssettjar tal-wisgħa tal-ferq ta' $9\frac{1}{2}$, jiġifieri 0,095 mm. L-utenti għandhom ikunu konxji li l-mikroskopji korneali jistgħu jagħtu kejl differenti tal-ħxuna tal-kornea jekk l-issettjar tal-wisgħa tal-fetħa jkun differenti.

Tabella 3

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għan-nefħa tal-kornea.

Nefħa Medja tal-Kornea (%) (*)	Klassi tal-ICE
0 sa 5	I
> 5 sa 12	II
> 12 sa 18 (> 75 min wara t-trattament)	II
> 12 sa 18 (≤ 75 min wara t-trattament)	III
> 18 sa 26	III
> 26 sa 32 (> 75 min wara t-trattament)	III
> 26 sa 32 (≤ 75 min wara t-trattament)	IV
> 32	IV

(*) L-ogħla punteġġ medju osservat fi kwalunkwe punt tal-ħin

Tabella 4

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għall-opaċità.

Punteġġ Medju Massimu tal-Opaċità (*)	Klassi tal-ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Il-punteġġ medju massimu osservat fi kwalunkwe punt tal-ħin (fuq il-bażi ta' punteġġi tal-opaċità kif definiti fit-Tabella 1).

Tabella 5

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għaż-żamma medja tal-fluworexxeina.

Punteġġ Medju taż-Żamma tal-Fluworexxeina fit-30 minuta ta' wara t-trattament (*)	Klassi tal-ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Fuq il-bażi tal-punteġġi kif definiti fit-Tabella 2.

Il-klassifikazzjoni *in vitro* għal sustanza kimika tat-test hija vvalutata billi tinqara l-klassifikazzjoni tal-GHS li tikkorrispondi għat-tabħlita ta' kategoriji miksuba għal nefħa korneali, opaċità korneali, u żamma tal-fluworexxeina kif deskritti fit-Tabella 6.

▼M7

Tabella 6

Klassifikazzjonijiet *in vitro* kumplessivi.

Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU	Taħlitiet tat-3 Punti ta' Tmiem
Ebda Kategorija	3 × I 2 × I, 1 × II
Ma tista' ssir ebda previżjoni	Taħlitiet oħrajn
Kategorija 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opaċità tal-kornea ≥ 3 fit-30 min (tal-anqas f'2 għajnejn) Opaċità tal-kornea = 4 fi kwalunkwe ħin (tal-anqas f'żewġ (2) għajnejn) Illaxkar sever tal-epitelju (tal-anqas f'għajn waħda)

(*) Taħlitiet inqas probabbli li jseħħu.

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tal-Istudju

Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontrolli negattivi jew tal-veikolu/solvent paralleli u l-kontrolli pożittivi paralleli jiġu identifikati bħala Mhux Ikklassifikati taħt il-GHS u tal-Kategorija 1 tal-GHS, rispettivament.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

— Isem tas-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) pereżempju l-isem strutturali użat mill-Chemical Abstracts Service (CAS), segwit minn ismijiet oħrajn, jekk ikunu magħrufin;

— in-Numru tar-Reġistru (RN) tas-CAS, jekk ikun magħruf;

— Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test / tal-kontroll (f'perċentwal(i) skont il-piż), sakemm din l-informazzjoni tkun disponibbli;

— Proprjetajiet fiżikokimiċi bħall-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, il-klassi kimika, is-solubilità fl-ilma rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

— Trattament tas-sustanzi kimiċi tat-test/ta' kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, tħin);

— L-istabilità, jekk tkun magħrufa;

Informazzjoni dwar l-Isponser u l-Faċilità tat-Test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Identifikazzjoni tas-sors tal-għajnejn (eż. il-faċilità minn fejn inġabru);

Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar

— Deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata;

▼M7

— Il-mikrosopju korneali użat (eż. mudell) u l-issettjar tal-istrument għall-mikroskopju korneali użat;

— Referenza għal riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv u, jekk applikabbli, dejta storika li turi l-meded aċċettabbli tal-kontroll ta' referenza parallel;

— Il-proċedura użata sabiex tiġi żgurata l-integrità (jiġifieri l-preċiżjoni u l-affidabilità) tal-metodu ta' ttestjar maż-żmien (eż. ittestjar perjodiku tas-sustanzi kimiċi tal-profiċjenza).

Il-Ġbir u l-Preparazzjoni tal-Għajnejn

— L-età u l-piż tal-annimal donatur u, jekk disponibbli, karatteristiċi oħrajn tal-annimali li minnhom inġabru l-għajnejn (eż. sess, razza);

— Il-kundizzjonijiet tat-trasport u l-ħżin tal-għajnejn (eż., id-data u l-ħin meta nġabru l-għajnejn, l-intervall tal-ħin bejn il-ġbir tal-irjus tat-tiġieġ u t-tqegħid tal-għajnejn enukleati f'kavità tas-superfużjoni);

— Il-preparazzjoni u l-immuntar tal-għajnejn, inklużi dikjarazzjonijiet fuq il-kwalità tagħhom, it-temperatura tal-kavitajiet tal-għajnejn, u l-kriterji għall-għażla tal-għajnejn użati għall-ittestjar.

Proċedura tat-test

— In-numru ta' repliki użati;

— L-identità tal-kontrolli negattivi u pożittivi użati (jekk applikabbli, anki s-solvent u l-kontrolli ta' riferiment);

— Id-doża tas-sustanza kimika tat-test, l-applikazzjoni u l-ħin tal-esponiment użati;

— Il-punti tal-ħin tal-osservazzjoni (qabel u wara t-trattament);

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

— Tabella li tispjega l-punteġġi ta' żamma tal-fluworexxeina, l-opaċità u n-nefħa korneali miksubin għal kull għajn individwali f'kull punt tal-ħin tal-osservazzjoni, inklużi l-punteġġi medji f'kull ħin tal-osservazzjoni tal-għajnejn ittestjati kollha;

— L-ogħla punteġġi ta' nefħa tal-kornea, opaċità u żamma tal-fluworexxeina osservati (minn kwalunkwe punt tal-ħin), u l-klassi tal-ICE marbutin.

— Deskrizzjoni ta' kull effett ieħor osservat;

— Il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU in vitro derivata;

— Jekk xieraq, ritratti tal-għajn;

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjoni

▼**M7**

TAGĦRIF

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponibbli fuq: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm

(4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

(6) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/korrużjoni akuta tal-għajnejn.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

(8) OECD (2011) Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Disponibbli fuq: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibbli fuq: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta'"rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika ta' riferiment: Sustanza kimika użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i), sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii), similarità strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi kimiċi ttestjati; (iii), karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufin; (iv), dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufin; (v), potenza magħrufa fl-iskala tar-rispons mixtieq

Approċċ Minn Isfel Għal Fuq: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika ssuspettata li ma teħtieġx klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-għajn li tiksi l-iris u l-pupilla u tħalli d-dawl jgħaddi għal ġol-parti interna tal-għajn.

Opaċità tal-kornea: Kejl tal-estensjoni tal-opaċità tal-kornea wara esponiment għal sustanza kimika tat-test. Żieda fl-opaċità tal-kornea hija indikattiva ta' ħsara fil-kornea.

Nefħa fil-kornea: Kejl oġġettiv fit-test tal-ICE tal-estensjoni tad-distensjoni tal-kornea wara esponiment għas-sustanza kimika tat-test. Din tiġi espressa bħala perċentwal u kkalkolata mill-ewwel kejl (qabel id-dożaġġ) tal-ħxuna tal-kornea u l-ħxuna rreġistrata f'intervalli regolari wara esponiment għas-sustanza kimika tat-test, fit-test tal-ICE. Il-grad tan-nefħa tal-kornea huwa indikattiv tal-ħsara fil-kornea.

Irritazzjoni tal-għajnejn: Il-produzzjoni ta' tibdiliet fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ anterjuri tal-għajn, li huma kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti reversibbli fuq l-Għajnejn" u mal-"Kategorija 2 tal-GHS tan-NU" (4).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' foloz pożittivi: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Żamma tal-fluworexxeina: Kejl suġġettiv fit-test tal-ICE ta' kemm is-sodju tal-fluworexxeina jinżamm miċ-ċelloli tal-epitelju fil-kornea wara l-esponiment għas-sustanza tat-test. L-ammont ta' fluworexxeina li jinżamm huwa indikattiv tal-ħsara fl-epitelju tal-kornea.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

Effetti irreversibbli fuq l-għajnejn: ara "Ħsara serja lill-għajnejn" u "Kategorija 1 tal-GHS tan-NU".

▼M7

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreaġixxux (4)

Kontroll negattiv: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Mhux ikklassifikati: Sustanzi li mhumiex ikklassifikati għal irritazzjoni tal-għajnejn (Kategorija 2 tal-GHS tan-NU) jew ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU). Interkambjabbli ma' "Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU".

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u ttrattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons sever ma għandux ikun eċċessiv.

Affidabilità: Kejliet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Tiġi vvalutatata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Effetti reversibbli fuq l-Għajnejn: ara "Irritazzjoni tal-għajnejn" u "Kategorija 2 tal-GHS tan-NU".

Ħsara serja lill-għajnejn: Il-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-għajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wiċċ quddiemi tal-għajn, li ma jkunux riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti irreversibbli fuq l-għajnejn" u mal-"Kategorija 1 tal-GHS tan-NU" (4).

Mikroskopju korneali: Strument li jintuża biex l-għajn tiġi eżaminata b'mod dirett taħt l-ingrandiment ta' mikroskopju binokulari billi joħloq immaġni dritta u stereoskopika. Fil-metodu ta' ttestjar tal-ICE, dan l-istrument jintuża sabiex wieħed ikun jista' jara l-istrutturi anterjuri ta' għajn it-tiġieiġa kif ukoll biex ikejjel b'mod oġġettiv il-ħxuna tal-kornea b'apparat li jitwaħħal mal-istrument u li jkejjel il-fond.

Kontroll tas-solvent/veikolu: Kampjun mhux ittrattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi pproċessat mal-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv parallel, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha (4).

Tensjoattiv: Imsejjaħ ukoll aġent tensjoattiv, dan huwa sustanza, bħal deterġent, li tista' tnaqqas it-tensjoni fil-wiċċ ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtella' r-raġħwa jew jippenetra solidi; huwa magħruf ukoll bħala aġent li jxarrab.

▼M7

Approċċ Minn Fuq Għal Isfel: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika ssuspettata li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu negattiv).

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qiegħda tiġi ttestjata permezz ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali: Strateġija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi riveduta, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-ħaddiema tal-emerġenza) u l-ambjent (4).

Kategorija 1 tal-GHS tan-NU: ara "Ħsara serja lill-għajnejn" u/jew "Effetti irreversibbli fuq l-għajnejn".

Kategorija 2 tal-GHS tan-NU: ara "Irritazzjoni tal-Għajnejn" u/jew "Effetti reversibbli fuq l-għajnejn".

Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU: Sustanzi li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU. Interkambjabbli ma' "Mhux ikklassifikati".

Metodu ta' ttestjar ivvalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar ivvalidat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' preċiżjoni u affidabilità sabiex jitqies aċċettabli għall-għan propost.

Piż tal-evidenza: Il-proċess fejn jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' biċċiet ta' informazzjoni varji sabiex tintlaħaq u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza kimika li tkun ta' periklu.

▼M7

Appendiċi 2

SUSTANZI KIMIĊI TA' PROFIĊJENZA GĦALL-METODU TA' TTESTJAR TAL-ICE

Qabel l-użu ta' rutina ta' metodu ta' ttestjar li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-ħsara lill-għajnejn ta' 13-il sustanza kimika rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħażlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli tal-għajnejn fuq il-bażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (TG 405) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU) (4)(6). Kriterji tal-għażla oħrajn kienu li s-sustanzi kimiċi huma disponibbli fis-suq, li hemm dejta ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja għad-dispożizzjoni, u li hemm dejta ta' kwalità għolja miksuba mill-metodu *in vitro* tal-ICE. Hemm dejta ta' referenza disponibbli fl-SSD (5) u fid-Dokument ta' Reviżjoni ta' Sfond tal-ICCVAM għall-metodu ta' ttestjar tal-ICE (9).

Tabella 1

Is-sustanzi kimiċi rakkomandati għall-wiri tal-profiċjenza teknika bl-ICE

Sustanza Kimika	CASRN	Klassi kimika (1)	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni *In Vivo* (2)	Klassifikazzjoni *In Vitro* (3)
Klorur tal-benżalkonju (5 %)	8001-54-5	Kompost tal-onju	Likwidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Kloressidin	55-56-1	Ammin, Ammidin	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Aċidu dibenżojl-L-tartariku	2743-38-6	Aċidu karbossiliku, Ester	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Imidażol	288-32-4	Eteroċikliku	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Aċidu trikloroaċetiku (30 %)	76-03-9	Aċidu Karbossiliku	Likwidu	Kategorija 1	Kategorija 1
2,6-diklorobenż-ojl klorur	4659-45-4	Aloġenur tal-aċil	Likwidu	Kategorija 2A	Ma tista' ssir ebda previżjoni (4)
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melħ inorganiku	Solidu	Kategorija 2A (5)	Ma tista' ssir ebda previżjoni (4)
Etil-2-metilaċeto-aċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2 B	Ma tista' ssir ebda previżjoni (4)
Sulfossidu tad-dimetil	67-68-5	Kompost tal-kubrit organiku	Likwidu	Ebda Kategorija	Ebda Kategorija
Gliċerol	56-81-5	Alkoħol	Likwidu	Ebda Kategorija	Ebda kategorija (fil-limitu)
Metilċiklopentan	96-37-7	Idrokarbur (ċikliku)	Likwidu	Ebda Kategorija	Ebda Kategorija
n-Essan	110-54-3	Idrokarbur (aċikliku)	Likwidu	Ebda Kategorija	Ebda Kategorija

▼M7

Sustanza Kimika	CASRN	Klassi kimika ([1])	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni *In Vivo* ([2])	Klassifikazzjoni *In Vitro* ([3])
Triaċetin	102-76-1	Lipidu	Likwidu	Mhux ikklassifikat	Ebda Kategorija

Taqsiriet: CASRN = Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstracts Service

([1]) Klassijiet tas-sustanzi kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza kimika tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, fuq il-bażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-Librerija Nazzjonali tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi tal-Mediċina (MeSH) (disponibbli fuq http// www.nlm.nih.gov/mesh)

([2]) Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU (4)(6).

([3]) Abbażi tar-riżultati fl-ICE kif deskritti fit-tabella 6.

([4]) Taħlita tal-punteġġi tal-ICE għajr dawk deskritti fit-tabella 6 għall-identifikazzjoni ta' ebda kategorija tal-GHS u l-Kategorija 1 tal-GHS (ara t-tabella 6)

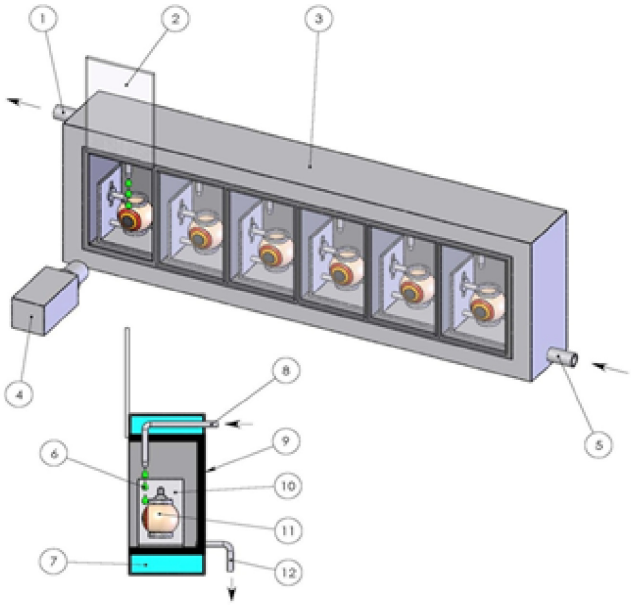
([5]) Klassifikazzjoni bħala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri 1 minn 3 vs 2 minn 3 annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji sabiex tiġi ġġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju *in vivo* kien jinkludi 3 annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-ħmura konġuntivali f'annimal wieħed irkupraw għal punteġġ ta' żero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkuprax għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' ħmura konġuntivali ta' 1 (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 10.

▼M7

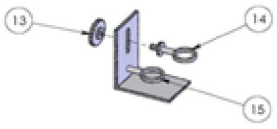
Appendiċi 3

DIJAGRAMMI TAL-APPARAT TAS-SUPERFUŻJONI TAS-SILĠ U L-KLAMPI TAL-GHAJNEJN

(Ara Burton et al. (18) għal deskrizzjonijiet ġeneriċi addizzjonali tal-apparat tas-superfużjoni u l-klampijiet tal-għajnejn)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Nru tal-Oġġett	Deskrizzjoni	Nru tal-Oġġett	Deskrizzjoni
1	Ilma sħun tal-iżbokk	9	Kompartiment
2	Bieb jiżżerżaq	10	Apparat fejn titqiegħed l-għajn
3	Apparat tas-superfużjoni	11	Għajn tat-tiġieġa
4	Strument tal-kejl ottiku	12	Soluzzjoni salina tal-iżbokk
5	Bokka tal-ilma sħun	13	Vit
6	Soluzzjoni salina	14	Lieva ta' fuq aġġustabbli
7	Ilma sħun	15	Lieva t'isfel aġġustabbli
8	Soluzzjoni salina tal-bokka		

▼M7

B.49. TEST *IN VITRO* TAL-MIKRONUKLEU TAĊ-ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 487 (2016). Huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Ġie żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (1).

It-test *in vitro* tal-mikronukleu (MNvit) hija test tal-ġenotossiċità għall-individwazzjoni ta' mikronukleji (MN) fiċ-ċitoplażma ta' ċelloli fl-interfażi. Il-mikronukleji jistgħu joriġinaw minn frammenti ta' kromożomi aċentriċi (jiġifieri li ma għandhomx ċentromeru), jew kromożomi sħaħ li ma jistgħux jemigraw lejn il-poli waqt l-istadju tal-anafaži tad-diviżjoni taċ-ċelloli. Għaldaqstant, it-test MNvit huwa metodu *in vitro* li jipprovdi bażi komprensiva għall-investigazzjoni ta' potenzjal ta' ħsara fil-kromożomi *in vitro* għaliex kemm l-anewġeni kif ukoll il-klastoġeni jistgħu jiġu individwati (2) (3) f'ċelloli li tkun saritilhom diviżjoni taċ-ċelloli matul jew wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 13 għal iktar dettalji). Il-mikronukleji jirrappreżentaw ħsara li ġiet trażmessa lil ċelloli dixxendenti, filwaqt li aberrazzjonijiet tal-kromożomi magħduda fiċ-ċelloli fil-metafaži jistgħu ma jiġux trażmessi. Il-bidliet xorta waħda jistgħu ma jkunux kompatibbli mas-sopravvivenza taċ-ċelloli.

Dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti l-użu ta' protokolli bl-inibitur taċ-ċitokalażina B tal-polimerizzazzjoni tal-attina (ċitoB) u mingħajr dan l-inibitur. Iż-żieda taċ-ċitoB qabel il-mitoži tirriżulta f'ċelloli li jkunu binukleati u, għalhekk, tippermetti li jiġu identifikati u analizzati mikronukleji biss f'dawk iċ-ċelloli li jkunu għamlu mitoži waħda (4) (5). Dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti wkoll l-użu ta' protokolli mingħajr imblokkatur taċ-ċitokineżi, sakemm ikun hemm evidenza li l-popolazzjoni ta' ċelloli analizzati għaddiet minn mitoži.

Minbarra l-użu tat-test tal-MNvit sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li jinduċu l-mikronukleji, l-użu ta' tikkettar immunokimiku ta' kinetoċori, jew l-ibridizzazzjoni b'sondi ċentromeriċi/telomeriċi (ibridizzazzjoni *in situ* ta' fluworexxenza (FISH)), ukoll jistgħu jipprovdu informazzjoni addizzjonali dwar il-mekkaniżmi ta' ħsara fil-kromożomi u tal-formazzjoni ta' mikronukleji (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Dawk il-proċeduri ta' tikkettar u ibridizzazzjoni jistgħu jintużaw meta jkun hemm żieda fil-formazzjoni ta' mikronukleji u l-investigatur ikun jixtieq jiddetermina jekk iż-żieda kinitx ir-riżultat ta' avvenimenti klastoġeniċi u/jew anewġeniċi.

Peress li l-mikronukleji fiċ-ċelloli fl-interfażi jistgħu jiġu vvalutati b'mod relattivament oġġettiv, il-persunal tal-laboratorju jrid jiddetermina biss in-numru ta' ċelloli binukleati meta tintuża ċitoB u l-inċidenza ta' ċelloli mikronukleati fil-każijiet kollha. Għalhekk, il-lametti jistgħu jiġu kklassifikati relattivament malajr u l-analiżi tista' tiġi awtomatizzata. Dan jagħmilha prattika li eluf minflok mijiet ta' ċelloli jiġu kklassifikati f'kull trattament, biex b'hekk tiżdied il-qawwa tat-test. Fl-aħħar nett, minħabba li l-mikronukleji jistgħu joħorġu minn kromożomi tardivi, hemm il-potenzjal li wieħed jindividwa sustanzi li jinduċu anewplojdi li huma diffiċli li wieħed jistudjahom f'testijiet konvenzjonali tal-aberrazzjoni kromożomika, eż. il-Kapitolu B.10 ta' dan l-anness (18). Madankollu, it-test MNvit kif deskritt fil-metodu ta' ttestjar ma jippermettix li ssir differenzazzjoni bejn sustanzi kimiċi li jinduċu bidliet fin-numru ta' kromożomi u/jew plojdija minn dawk li jinduċu klastoġeniċità mingħajr tekniki speċjali bħall-FISH imsemmijin fil-paragrafu 4.

It-test MNvit huwa b'saħħitu u jista' jsir f'varjetà ta' tipi ta' ċelloli, u fil-preżenza jew fin-nuqqas ta' ċitoB. Hemm dejta estensiva li ssostni l-validità tat-test MNvit bl-użu ta' diversi tipi ta' ċelloli (kulturi ta' linji ta' ċelloli jew kulturi ta' ċelloli primarji) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Dawn jinkludu, b'mod partikolari, l-istudji ta' validazzjoni internazzjonali kkoordinati mis-Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) u r-rapporti tal-Grupp ta' Ħidma Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossiċità (5) (17). Id-dejta disponibbli ġiet evalwata mill-ġdid fi

▼M7

studju ta' validazzjoni retrospettiv skont il-piż tal-evidenza miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) tal-Kummissjoni Ewropea (KE), u l-metodu tat-test ġie approvat bħala xjentifikament validu mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

It-test in vitro MNvit taċ-ċelloli tal-mammiferi jista' juża kulturi ta' linji ta' ċelloli jew kulturi ta' ċelloli primarji ta' oriġini mill-bniedem jew minn rodituri. Minħabba li l-frekwenza tal-isfond tal-mikronukleji tinfluwenza s-sensittività tat-test, huwa rrakkomandat li jintużaw tipi ta' ċelloli bi frekwenza ta' sfond definita u stabbli ta' formazzjoni ta' mikronukleji. Iċ-ċelloli użati jintgħażlu fuq il-bażi tal-ħila li jikbru sew fil-kultura, l-istabilità tal-karjotip (inkluż in-numru ta' kromożomi) u l-frekwenza spontanja ta' mikronukleji (40). Bħalissa, id-dejta disponibbli ma tippermettix li jinħarġu rakkomandazzjonijiet assoluti iżda tissuġġerixxi li, meta jiġu evalwati l-perikli kimiċi, huwa importanti li jiġu kkunsidrati l-istatus *p53*, l-istabilità ġenetika (karjotip), il-kapaċità ta' tiswija tad-DNA u l-oriġini (minn rodituri jew mill-bniedem) taċ-ċelloli magħżulin għall-ittestjar. Għalhekk, dawk li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar huma mħeġġin jikkunsidraw l-influwenza ta' dawn il-karatteristiċi u karatteristiċi oħrajn taċ-ċelloli fuq il-prestazzjoni ta' linja ta' ċelloli fis-sejbien tal-induzzjoni ta' mikronukleji, peress li l-għarfien dejjem qiegħed jiżdied f'dan il-qasam.

Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

It-testijiet li jsiru *in vitro* ġeneralment jirrekjedu l-użu ta' sors eżoġeniku ta' attivazzjoni metabolika sakemm iċ-ċelloli ma jkunux metabolikament kompetenti fir-rigward tas-sustanzi kimiċi tat-test. Is-sistema eżoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*. Wieħed għandu joqgħod attent sabiex jevita kundizzjonijiet li jitsgħu jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali li ma jirriflettux il-ġenotossiċità tas-sustanzi kimiċi tat-test. Kundizzjonijiet bħal dawn jinkludu bidliet fil-pH (41) (42) (43) jew l-ożmolalità, interazzjoni mal-medium tal-kultura taċ-ċelloli (44) (45) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossiċità (ara l-paragrafu 29).

Sabiex wieħed janalizza l-induzzjoni tal-mikronukleji, huwa essenzjali li l-mitożi tkun seħħet kemm fil-kultivazzjonijiet ittrattati kif ukoll f'dawk mhux ittrattati. L-iktar stadju informattiv għall-għadd tal-mikronukleji huwa f'ċelloli li temmew mitożi waħda waqt jew wara t-trattament bis-sustanza kimika tat-test. Għal Nanomaterjali Manifatturati, hemm bżonn li jsiru adattamenti speċifiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar li ma jkunux deskritti fih.

Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-kulturi ta' ċelloli ta' oriġini umana jew minn mammiferi oħrajn huma esposti għas-sustanza kimika tat-test kemm b'sors eżoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr dan is-sors sakemm ma jintużawx ċelloli b'kapaċità metabolizzanti adegwata (ara l-paragrafu 19).

Matul jew wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test, iċ-ċelloli jitkabbru għal perjodu twil biżżejjed sabiex il-ħsara fil-kromożomi jew effetti oħran fuq iċ-ċiklu taċ-ċellola/id-diviżjoni taċ-ċellola jwasslu għall-formazzjoni ta' mikronukleji fiċ-ċelloli fl-interfażi. Għall-induzzjoni tal-anewplojdi, is-sustanza kimika tat-test għandha normalment tkun preżenti waqt il-mitożi. Ċelloli fl-interfażi miġbura u mlewna jiġu analizzati għall-preżenza ta' mikronukleji. Idealment, il-mikronukleji għandhom jingħaddu biss f'dawk iċ-ċelloli li jkunu temmew il-mitożi waqt l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test jew waqt il-perjodu ta' wara t-trattament, jekk jintuża wieħed. F'kulturi li ġew ittrattati b'imblokkatur taċ-ċitokineżi, dan jinkiseb faċilment billi jingħaddu biss iċ-ċelloli binukleati. Fin-nuqqas ta'

▼M7

mblokkatur taċ-ċitokineżi, importanti li jintwera li ċ-ċelloli analizzati aktarx li jkunu għaddew minn diviżjoni taċ-ċelloli, fuq il-bażi ta' żieda fil-popolazzjoni taċ-ċelloli, matul jew wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test. Għall-protokolli kollha, huwa importanti li jintwera li l-proliferazzjoni taċ-ċelloli seħħet kemm fil-kulturi tal-kontroll kif ukoll f'dawk tat-trattament, u l-grad ta' ċitotossiċità jew ċitostażi indotta mis-sustanza kimika tat-test għandu jiġi vvalutat fil-kulturi kollha li jingħaddu għall-mikronukleji.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Ċelloli

Jistgħu jintużaw linfoċiti periferiċi tad-demm primarji kkulturati mill-bniedem jew mammiferi oħrajn (7) (20) (46) (47) u numru ta' linji ta' ċelloli ta' rodituri bħal CHO, V79, CHL/IU, u ċelloli L5178Y jew linji ta' ċelloli tal-bniedem bħat-TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (ara l-paragrafu 6). Linji ta' ċelloli oħrajn bħal HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), ċelloli HepG2 (52) (53), A549 u ċelloli primarji tal-Embriju tal-Ħamster Sirjan (54) intużaw għall-ittestjar tal-mikronukleji iżda, għalissa, għadhom ma ġewx ivvalidati b'mod estensiv. Għaldaqstant, l-użu ta' dawk il-linji u tipi ta' ċelloli għandu jkun iġġustifikat abbażi tal-prestazzjoni tagħhom murija fit-test, kif deskritt fit-taqsima dwar il-Kriterji ta' Aċċettazzjoni. Ġie rrapportat li ċito B għandha l-potenzjal li tħalli impatt fuq it-tkabbir taċ-ċelloli L5178Y u, għalhekk, mhijiex irrakkomandata ma' din il-linja ta' ċelloli (23). Meta jintużaw ċelloli prmiarji, għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' ċelloli ta' oriġini umana meta dan ikun fattibbli u dawn għandhom jiġu kampjunati skont il-prinċipji u r-regolamenti etiċi umani.

Il-linfoċiti periferiċi tad-demm tal-bniedem għandhom jinkisbu mingħand individwi żgħażagħ (madwar 18-35 sena) li ma jpejpux u li ma għandhom ebda marda magħrufa jew li ma kinux esposti riċentement għal aġenti ġenotossiċi (eż. sustanzi kimiċi, radjazzjoni jonizzanti) f'livelli li jżidu l-inċidenza ta' sfond ta' ċelloli mikronukleati. Dan jiżgura li l-inċidenza ta' sfond ta' ċelloli mikronukleati tibqa' baxxa u konsistenti. L-inċidenza bażi ta' ċelloli mikronukleati tiżdied mal-età, u din it-tendenza hija iktar evidenti fin-nisa milli fl-irġiel (55). Jekk jinġabru flimkien ċelloli mingħand iktar minn donatur wieħed, għandu jiġi speċifikat l-għadd ta' donaturi. Hemm bżonn li jintwera li ċ-ċelloli nqasmu sa mill-bidu nett tat-trattament bis-sustanza kimika tat-test sal-kampjunar taċ-ċelloli. Il-kulturi taċ-ċelloli jinżammu f'fażi ta' tkabbir esponenzjali (linji ta' ċelloli) jew jiġu stimolati sabiex jinqasmu (kulturi primarji ta' linfoċiti), sabiex jesponu ċ-ċelloli fi stadji differenti taċ-ċiklu taċ-ċelloli, peress li jaf ma tkunx magħrufa s-sensittività tal-istadji taċ-ċelloli għas-sustanzi kimiċi. Iċ-ċelloli primarji li jeħtieġu stimolazzjoni b'aġenti mitoġeniċi sabiex jinqasmu ġeneralment ma jibqgħux sinkronizzati matul l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (eż. linfoċiti umani wara stimolazzjoni mitoġenika ta' 48 siegħa). L-użu ta' ċelloli sinkronizzati matul it-trattament bis-sustanza kimika tat-test mhuwiex rakkomandat, iżda jista' jkun aċċettabbli jekk ikun iġġustifikat.

Il-kundizzjonijiet tal-media tal-kultura

Għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tal-kultura u tal-inkubazzjoni (reċipjenti tal-kultura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO_2 jekk xieraq, temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37 °C) għaż-żamma tal-kulturi. Il-linji ta' ċelloli għandhom jiġu verifikati b'mod regolari għall-istabilità tal-għadd ta' kromożomi modali u l-assenza ta' kontaminazzjoni tal-Mikoplażma, u ċ-ċelloli ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati jew jekk jinbidel l-għadd ta' kromożomi modali. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli tal-linji ta' ċelloli jew il-kulturi prmiarji użati fil-laboratorju tat-testijiet għandu jkun stabbilit u konsistenti mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati.

▼M7

Preparazzjoni tal-kulturi

Linji ta' ċelloli: iċ-ċelloli huma propagati minn kulturi omm, imqegħdin fil-medium tal-kultura f'densità b'tali mod li ċ-ċelloli f'sospensjonijiet jew f'monosaffi jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali sal-ħin tal-ġbir (eż. għandha tiġi evitata konfluwenza għal ċelloli li jikbru f'monosaffi).

Linfoċiti: demm sħiħ ittrattat b'antikoagulant (eż. eparina) jew linfoċiti separati jiġu kulturati (eż. għal 48 siegħa għal linfoċiti umani) fil-preżenza ta' mitoġenu (eż. fitoemagglutinina (PHA għal linfoċiti umani) sabiex tiġi indotta diviżjoni taċ-ċelloli qabel l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test u ċitoB.

Attivazzjoni metabolika

Għandhom jintużaw sistemi eżoġeni ta' metabolizzazzjoni meta jintużaw ċelloli b'kapaċità metabolika endoġena inadegwata. L-iktar sistema użata spiss li hija l-ewwel rakkomandata, sakemm ma tkunx iġġustifikata sistema oħra, hija frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imħejjija mill-fwied ta' rodituri (ġeneralment firien) ittrattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (56) (57) jew taħlita ta' fenobarbital u b-naftoflavon (58) (59) (60). Din it-taħlita msemmija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes (61) u ntwera li hija effettiva daqs Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidażijiet b'funzjoni mħallta (58) (59) (60). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1 sa 2 % (v/v) iżda tista' tiżdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-użu ta' prodotti li jnaqqsu l-indiċi mitotiku, speċjalment prodotti ta' kumplessazzjoni tal-kalċju (62) għandu jiġi evitat matul it-trattament. L-għażla tat-tip u l-konċentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena jew induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi kimiċi li jiġu ttestjati.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokolli standard, bħat-trattament f'reċipjenti ssiġillati (63) (64) (65). Il-preparamenti tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin.

Kundizzjonijiet tat-test

Solventi

Is-solvent għandu jingħażel sabiex tiġi ottimizzata s-solubilità tas-sustanza kimika tat-test mingħajr ma jitħalla impatt avvers fuq it-twettiq tal-assaġġ, jiġifieri bidla fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-kultura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Huwa rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tal-kultura). Fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma jew is-sulfossidu tad-dimetil (DMSO). B'mod ġenerali, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbżu l-1 % (v/v). Jekk iċ-ċitoB tiġi dissolta f'DMSO, l-ammont totali ta' solvent organiku użat kemm għas-sustanza kimika

▼M7

tat-test kif ukoll għaċ-ċitoB ma għandux jaqbeż il-1 % (v/v); inkella, għandhom jintużaw kontrolli mhux ittrattati sabiex jiġi żgurat li l-perċentwal ta' solvent organiku ma jkollux effett avvers. Is-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbżu l-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk jintużaw solventi mhux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn dejta li tindika l-kompatibilità tagħhom mas-sustanza kimika tat-test, is-sistema tat-test u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika fil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-dejta ta' sostenn, importanti li jiġu inklużi kontrolli mhux ittrattati (ara l-Appendiċi 1) kif ukoll kontrolli tas-solvent sabiex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduċi ebda effett dannuż jew kromożomiku (eż. anewplojdija jew klastoġeniċità).

L-użu ta' ċitoB bħala imblokkatur taċ-ċitokineżi

Waħda mill-aktar kunsiderazzjonijiet importanti fit-twettiq tat-test MNvit hija l-iżgurar li ċ-ċelloli magħduda temmew il-mitożi waqt it-trattament jew il-perjodu ta' inkubazzjoni wara t-trattament, jekk jintuża wieħed. L-għadd tal-mikronukleji, għalhekk, għandu jkun illimitat għal ċelloli li għaddew minn mitożi waqt jew wara t-trattament. ĊitoB hija s-sustanza li ntużat l-aktar sabiex timblokka ċ-ċitokineżi minħabba li tinibixxi l-ġbir tal-attina, u b'hekk tipprevjeni s-separazzjoni taċ-ċelloli dixxendenti wara l-mitożi, li twassal għall-formazzjoni ta' ċelloli binukleati (6) (66) (67). L-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq il-kinetika tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jista' jitkejjel fl-istess ħin, jekk tintuża ċitoB. Iċ-ċitoB għandha tintuża bħala imblokkatur taċ-ċitokineżi meta l-linfoċiti tal-bniedem jintużaw minħabba li l-ħinijiet taċ-ċikli taċ-ċelloli jkunu varjabbli fost id-donaturi u minħabba li mhux il-linfoċiti kollha jirreaġixxu għall-istimolazzjoni tal-PHA. Iċ-ċitoB mhijiex obbligatorja għal tipi ta' ċelloli oħrajn jekk ikun stabbilit li għaddew minn diviżjoni kif deskritta fil-paragrafu 27. Barra minn hekk, ġeneralment iċ-ċitoB ma tintużax meta l-kampjuni jiġu evalwati għal mikronukleji bl-użu ta' metodi ċitometriċi tal-fluss.

Il-konċentrazzjoni xierqa taċ-ċitoB għandha tiġi stabbilita mil-laboratorju għal kull tip ta' ċellola sabiex tinkiseb il-frekwenza ottimali ta' ċelloli binukleati fil-kulturi tal-kontroll tas-solvent u għandu jintwera li din tipproduċi ammont tajjeb ta' ċelloli binukleati għall-għoti ta' punteġġ. Il-konċentrazzjoni xierqa ta' ċitoB normalment tkun bejn 3 u 6 μg/ml (19).

Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli u ċ-ċitotossiċità u l-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-trattament

Meta wieħed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva (ara l-paragrafu 29), il-preċipitazzjoni fil-medium tal-kultura (ara l-paragrafu 30), jew bidliet ċari fil-pH jew ożmolalità (ara l-paragrafu 9). Jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna bidla ċara fil-pH tal-medium fi żmien iż-żieda, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali sabiex jiġu evitati riżultati pożittivi artifattwali u sabiex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-kultura.

Il-kejliet tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jsiru sabiex ikun żgurat li biżżejjed ċelloli ttrattati jkunu laħqu l-faża tal-mitożi waqt it-test u li t-trattamenti jsiru fil-livelli xierqa ta' ċitotossiċità (ara l-paragrafu 29). Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi stabbilita fl-esperiment ewlieni b'attivazzjoni metabolika u mingħajr bl-użu ta' indikazzjoni xierqa ta' mewt u tkabbir taċ-ċelloli (ara l-paragrafi 26 u 27). Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità f'test preliminari inizjali tista' tkun siewja sabiex jiġu definiti aħjar il-konċentrazzjonijiet li sejrin jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex obbligatorju. Jekk isir, ma għandux isir minflok il-kejl taċ-ċitotossiċità fl-esperiment ewlieni.

It-trattament tal-kulturi b'ċitoB, u l-kejl tal-frekwenzi relattivi ta' ċelloli mononukleati, binukleati jew multinukleati fil-kultura, jipprovdi metodu eżatt tal-kwantifikazzjoni tal-effett fuq il-proliferazzjoni taċ-ċelloli u l-attività ċitotossika jew ċitostatika ta' trattament (6), u jiżgura li ċelloli li nqasmu waqt jew wara t-trattament biss jingħaddu bil-mikroskopju. L-indiċi tal-proliferazzjoni b'imblokkar

▼M7

taċ-ċitokineżi (CBPI) (6) (27) (68) jew l-Indiċi tar-Replikazzjoni (RI) minn tal-inqas 500 ċellola għal kull kultura (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli) huma rakkomandati sabiex tiġi stmata l-attività ċitotossika u ċitostatika ta' trattament billi jitqabblu l-valuri fil-kulturi tat-trattament u tal-kontroll. Il-valutazzjoni ta' indikaturi oħrajn ta' ċitotossiċità (eż. l-integrità taċ-ċelloli, l-apoptożi, in-nekrożi, l-għadd tal-metafażi, iċ-ċiklu taċ-ċelloli) tista' tkun informazzjoni siewja, iżda ma għandhiex tintuża minflok is-CBPI jew l-RI.

Fi studji mingħajr ċitoB, hemm bżonn li jintwera li ċ-ċelloli fil-kultura nqasmu, sabiex sehem sostanzjali taċ-ċelloli magħdudin ikunu ġew diviżi matul jew wara t-trattament bis-sustanza kimika tat-test, inkella jistgħu jiġu prodotti risponsi foloz negattivi. Il-kejl tal-Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD) jew iż-Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC) huwa rakkomandat sabiex tiġi stmata l-attività ċitotossika u ċitostatika ta' trattament (17) (68) (69) (70) (71) (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli). F'ħinijiet tal-kampjunar estiżi (eż. trattament għal darba u nofs jew id-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli u ġbir wara darba u nofs jew id-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli, li jwasslu għal ħinijiet tal-kampjunar itwal minn 3-4 darbiet it-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli b'kollox kif deskritt fil-paragrafi 38 u 39), l-RPD jista' jissottovaluta ċ-ċitotossiċità (71). F'dawn iċ-ċirkustanzi, l-RICC tista' tipprovdi kejl aħjar jew inkella l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità wara darba u nofs sad-doppju tat-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali tkun stima siewja. Il-valutazzjoni ta' indikaturi oħrajn ta' ċitotossiċità jew ċitostaži (eż. l-integrità taċ-ċelloli, l-apoptożi, in-nekrożi, l-għadd tal-metafaži, l-Indiċi tal-proliferazzjoni (PI), iċ-ċiklu taċ-ċelloli, il-pontijiet nukleoplażmiċi jew l-għejun nukleari) tista' tkun informazzjoni addizzjonali siewja, iżda ma għandhiex tintuża minflok l-RPD jew l-RICC.

Għandhom jiġu evalwati tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inklużi l-kontroll tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabilità (iċ-ċitotossiċità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Ikun xi jkun it-tip taċ-ċelloli (linji ta' ċelloli jew kulturi primarji ta' linfoċiti), jistgħu jintużaw kulturi rreplikati jew kulturi uniċi ttrattati f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Filwaqt li l-użu ta' kulturi duplikati huwa rakkomandat, kulturi uniċi huma aċċettabbli wkoll diment li jingħata punteġġ lill-istess numru totali ta' ċelloli għal kulturi uniċi jew kulturi duplikati. L-użu ta' kulturi waħedhom huwa ta' rilevanza partikolari meta jiġu vvalutati iktar minn 3 konċentrazzjonijiet (ara l-paragrafi 44-45). Ir-riżultati miksubin fil-kulturi rreplikati indipendenti f'konċentrazzjoni partikolari jistgħu jinġabru flimkien għall-analiżi tad-dejta. Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru tossiċità baxxa jew ebda tossiċità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-tripplu normalment ikunu xierqa. Meta sseħħ ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin għandhom ikopru firxa minn dik iċ-ċitotossiċità produttiva kif spjegat fil-paragrafu 29 u jinkludu konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossiċità moderata u baxxa jew ebda ċitotossiċità. Ħafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons wiqfin u, sabiex tinkiseb dejta f'ċitotossiċità baxxa u moderata jew sabiex tiġi studjata r-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons f'dettall, sejjer ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjoni spazjati iktar qrib xulxin u/jew iktar minn tliet konċentrazzjonijiet (kulturi waħedhom jew repliki), speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 60).

Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tikseb ċitotossiċità ta' 55 ± 5 % bl-użu tal-parametri rakkomandati dwar iċ-ċitotossiċità (jiġifieri tnaqqis fl-RICC u l-RPD għal linji ta' ċelloli meta ma tintużax ċitoB, u tnaqqis fis-CBPI jew l-RI meta tintuża ċitoB għal 45± 5 % tal-kontroll negattiv parallel) (72). Wieħed għandu joqgħod attent meta jinterpreta riżultati pożittivi li mbagħad jistgħu jinstabu li huma fil-parti superjuri ta' din il-firxa ta' ċitotossiċità ta' 55 ± 5 % (71).

▼M7

Għal sustanzi kimiċi tat-test ftit li xejn solubbli li mhumiex ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajnuna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossiċità sseħħ f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni waħda biss li tinduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artifattwali mill-preċipitat. Fil-konċentrazzjoni li tipproduċi preċipitat, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekkilx it-twettiq tat-test (eż. tilwin jew punteġġar). Id-determinazzjoni tas-solubilità fil-medium tal-kultura qabel l-esperiment tista' tkun utli.

Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossiċità li tillimita, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-inqas (73) (74) (75). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, il-prodotti ta' reazzjoni kumplessa jew il-materjal bijoloġiku (UVCB) (76), estratt ambjentali eċċ, il-konċentrazzjoni massima jaf trid tkun ogħla (eż. 5 mg/ml), fin-nuqqas ta' ċitotossiċità suffiċjenti, sabiex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wieħed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (93).

Kontrolli

Għal kull ħin tal-ġbir għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 21), li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u pproċessat bl-istess mod bħall-kulturi tat-trattament.

Kontrolli pożittivi paralleli huma meħtieġa sabiex juru l-ħila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' klastoġeni u anewġeni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat u l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena (meta applikabbli). Fit-tabella 1 ta' hawn taħt jingħataw xi eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv oħrajn, jekk ikunu ġġustifikati.

Fil-preżent, l-ebda anewġen ma huwa magħruf li jeħtieġ attivazzjoni metabolika għall-attività ġenotossika tiegħu (17). Peress li t-testijiet *in vitro* taċ-ċelloli tal-mammiferi huma standardizzati biżżejjed għal trattamenti fuq terminu qasir li jsiru b'mod parallel ma' u mingħajr attivazzjoni metabolika bl-użu tal-istess durata tat-trattament, l-użu tal-kontrolli pożittivi jista' jkun limitat għal klastoġenu li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. F'dan il-każ, rispons tal-kontroll pożittiv klastoġeniku wieħed sejjer juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u kemm hija risponsiva s-sistema tat-test. Madankollu, trattament fit-tul (mingħajr S9) għandu jkollu l-kontroll pożittiv tiegħu stess peress li d-durata tat-trattament sejra tvarja mit-test bl-użu tal-attivazzjoni metabolika. Jekk jingħażel klastoġenu bħala l-uniku kontroll pożittiv għal trattament fuq terminu qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajr, għandu jingħażel anewġen għat-trattament fit-tul mingħajr attivazzjoni metabolika. F'ċelloli metabolikament kompetenti li ma jeħtiġux S9, għandhom jintużaw kontrolli pożittivi kemm għall-klastoġeniċità kif ukoll għall-anewġeniċità.

Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'konċentrazzjoni waħda jew iktar mistennija li toffri żidiet riproduċibbli u identifikabbli fuq l-isfond sabiex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test (jiġifieri l-effetti huma ċari iżda ma jikxfux minnufih l-identità tal-lametti kodifikati lill-qarrej), u r-rispons ma għandux ikun f'riskju minħabba ċitotossiċità li taqbeż il-limiti speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M7

Tabella 1

Sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati għall-valutazzjoni tal-proficjenza tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi

Kategorija	Sustanza Kimika	CASRN
1. **Klastoġeni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika**		
	Metansulfonat tal-metil	66-27-3
	Mitomiċina C	50-07-7
	4-Nitrokinolina-N-Ossida	56-57-5
	Ċitożina arabinosida	147-94-4
2. **Klastoġeni li jeħtieġu attivazzjoni metabolika**		
	Benżo(a)piren	50-32-8
	Ċiklofosfammid	50-18-0
3. **Anewġeni**		
	Kolċisina	64-86-8
	Vinblastina	143-67-9

PROĊEDURA

Skeda tat-trattament

Sabiex tkun massimizzata l-probabbiltà tal-identifikazzjoni ta' anewġenu jew klastoġenu li jaġixxu fi stadju speċifiku fiċ-ċiklu taċ-ċelloli, huwa importanti li għadd suffiċjenti ta' ċelloli li jirrappreżenta d-diversi stadji kollha taċ-ċikli taċ-ċelloli tagħhm jiġu ttrattati bis-sustanza kimika tat-test. It-trattamenti kollha għandhom jibdew u jintemmu meta ċ-ċelloli jkunu qegħdin jikbru b'mod esponenzjali u ċ-ċelloli għandhom ikomplu jikbru sal-ħin tal-kampjunar. Għalhekk, l-iskeda tat-trattament għal-linji ta' ċelloli u l-kulturi ta' ċelloli primarji tista' tvarja mhux ftit minn dik tal-linfoċiti li jeħtieġu li l-istimolazzjoni mitoġenika tibda ċ-ċiklu taċ-ċelloli tagħhom (17). Għal-linfoċiti, l-iktar approċċ effiċjenti huwa li t-trattament jinbeda bis-sustanza kimika tat-test 44-48 siegħa wara l-istimolazzjoni tal-PHA, meta ċ-ċelloli jkunu qegħdin jinqsmu b'mod asinkroniku (6).

Id-dejta ppubblikata (19) tindika li ħafna mill-anewġeni u l-klastoġeni sejrin jinqabdu sa perjodu ta' trattament ta' 3 sa 6 sigħat fil-preżenza u n-nuqqas ta' S9, segwita mit-tneħħija tas-sustanza kimika tat-test u l-kampjunar f'ħin ekwivalenti għal madwar darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli wara l-bidu tat-trattament (7).

Madankollu, għal evalwazzjoni dettaljata, li tkun meħtieġa sabiex jiġi konkluż eżitu negattiv, għandhom isiru t-tliet kundizzjonijiet sperimentali kollha kemm huma li ġejjin bl-użu ta' trattament fuq terminu qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajrha u trattament fit-tul mingħajr attivazzjoni metabolika (ara l-paragrafi 56, 57 u 58):

— Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika għal 3-6 sigħat, u jiġu kampjunati f'ħin ekwivalenti għal madwar kull darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jinbeda t-trattament (19),

— Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika għal 3-6 sigħat, u jiġu kampjunati f'ħin ekwivalenti għal madwar kull darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jinbeda t-trattament (19),

▼M7

— Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti bla heda għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika sal-kampjunar f'ħin għal madwar kull darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli.

F'każ li xi waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali ta' hawn fuq twassa għal rispons pożittiv, jaf ma jkunx hemm bżonn li jiġi investigat xi wieħed mir-reġimi tat-trattament l-oħrajn.

Jekk ikun magħruf jew issuspettat li s-sustanza kimika tat-test taffettwa l-ħin taċ-ċikli taċ-ċelloli (eż meta jiġu ttestjati analogi nukleosidiċi), speċjalment għal ċelloli kompetenti p53 (35) (36) (77), il-ħinijiet tal-kampjunar jew tal-irkupru jistgħu jiġu estiżi sa darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli (jiġifieri total ta' 3 sa 4 darbiet it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jibdew it-trattamenti fuq terminu qasir u fit-tul). Dawn l-għażliet jindirizzaw is-sitwazzjonijiet li jista' jkun hemm tħassib dwarhom fir-rigward tal-interazzjonijiet possibbli bejn is-sustanza kimika tat-test u ċ-ċitoB. Meta jintużaw ħinijiet tal-kampjunar estiżi (jiġifieri total ta' 3 sa 4 darbiet iż-żmien tal-kultura tat-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli), wieħed għandu joqgħod attent li jiżgura li ċ-ċelloli jkunu għadhom qegħdin jinqasmu b'mod attiv. Pereżempju, għal linfoċiti, it-tkabbir esponenzjali jista' jibda jonqos wara 96 siegħa wara l-istimolazzjoni u kulturi monosaffi taċ-ċelloli jistgħu jsiru konfluwenti.

L-iskedi ssuġġeriti għat-trattament taċ-ċelloli huma miġburin fit-Tabella 2. Dawn l-iskedi ta' trattament ġenerali jistgħu jiġu mmodifikati (u għandhom ikunu ġġustifikati) skont l-istabilità jew ir-reattività tas-sustanza kimika tat-test jew il-karatteristiċi ta' tkabbir partikolari taċ-ċelloli li jkunu qegħdin jintużaw.

Tabella 2.

It-trattament taċ-ċelloli u l-perjodi tal-ġbir għat-test MNvit

Linfoċiti, ċelloli primarji u linji ta' ċelloli ttrattati biċ-ċitoB	+ S9 Trattament qasir	Trattament għal 3-6 sigħat fil-preżenza ta' S9; tneħħija tal-S9 u l-medium tat-trattament; żieda ta' medium ġdid u ċitoB; ġbir wara darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jibda t-trattament.
	– S9 Trattament qasir	Trattament għal 3-6 sigħat; tneħħija tal-medium tat-trattament; żieda ta' medium ġdid u ċitoB; ġbir wara darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jibda t-trattament.
	– S9 Trattament estiż	Trattament għal darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli fil-preżenza taċ-ċitoB; ġbir fi tmiem il-perjodu tat-trattament.
Linji ta' ċelloli ttrattati mingħajr ċitoB (L-istess bħall-iskedi tat-trattament spjegati hawn fuq, bl-eċċezzjoni li ma tiżdied ebda ċitoB)		

Għal kulturi monosaffi, iċ-ċelloli mitotiċi (identifikabbli għaliex huma tondi u maqlugħin mill-wiċċ) jistgħu jkunu preżenti fl-aħħar tat-trattament ta' bejn 3 u 6 sigħat. Minħabba li dawn iċ-ċelloli mitotiċi jistgħu jinqalgħu faċilment, jistgħu jintilfu meta jitneħħa l-medium li jkun fih is-sustanza kimika tat-test. Jekk hemm evidenza ta' żieda sostanzjali fin-numru ta' ċelloli mitotiċi meta mqabbla mal-kontrolli, xi ħaġa li tindika inibizzjoni mitotika, iċ-ċelloli għandhom jinġabru b'ċentrifugazzjoni u jiżdiedu lura mal-kulturi, sabiex jiġi evitat milli jintilfu ċelloli li huma f'mitożi, u f'riskju ta' aberrazzjoni kromożomika, f'ħin il-ġbir.

▼M7

Il-ġbir taċ-ċelloli u l-preparazzjoni tal-lametti

Kull kultura għandha tinġabar u tiġi pproċessata separatament. Il-preparazzjoni taċ-ċelloli tista' tinvolvi trattament ipotoniku, iżda dan il-pass mhuwiex neċessarju jekk jinkiseb tifrix adegwat taċ-ċelloli b'mod ieħor. Jistgħu jintużaw tekniki differenti fil-preparazzjoni tal-lametti sakemm jinkisbu preparazzjonijiet taċ-ċelloli ta' kwalità għolja għall-għoti tal-punti. Iċ-ċelloli b'membrana taċ-ċelloli intatti u ċitoplażma intatta għandhom jinżammu sabiex ikunu jistgħu jiġu individwati l-mikronukleji u (fil-metodu ta' mblokkar taċ-ċitokineżi) identifikazzjoni affidabbli ta' ċelloli binukleati.

Il-lametti jistgħu jingħataw il-kulur bl-użu ta' metodi varji, bħal Giemsa jew żebgħat speċifiċi fluworexxenti tad-DNA. L-użu ta' żebgħa fluworexxenti xierqa (eż. oranġjo tal-akridina (78) jew Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)) jista' jelimina xi whud mill-artifatti assoċjati mal-użu ta' tilwin mhux speċifiku għad-DNA. Antikorpi antikinetoċori, FISH b'sondi tad-DNA panċentromeriċi jew tikkettar *in situ* mogħti primer bi primers speċifiċi għall-panċetromeri, flimkien mal-kontrotilwin xieraq tad-DNA, sabiex jiġi identifikat il-kontenut (kromożomi sħaħ sejrin jiġu mlewnin filwaqt li frammenti tal-kromożomi aċentriċi le) ta' mikronukleji jekk l-informazzjoni mekkanistika dwar il-formazzjoni tagħhom tkun ta' interess (16) (17). Jistgħu jintużaw metodi oħrajn għal divrenzjar bejn il-klastoġeni u l-anewġeni jekk ikun intwera li dawn huma effettivi u vvalidati. Pereżempju, għal ċerti linji ta' ċelloli, il-kejliet ta' nukleji sub-2N bħala avvenimenti ipodiplojdi bl-użu ta' tekniki bħall-analiżi tal-immaġnijiet, iċ-ċitometrija ta' skennjar bil-laser jew ċitometrija tal-fluss jistgħu jipprovdu informazzjoni siewja wkoll (80) (81) (82). L-osservazzjonijiet morfoloġiċi tan-nukleji jistgħu jagħtu indikazzjonijiet ta' anewplojdija possibbli wkoll. Barra minn hekk, test għal aberrazzjonijiet kromożomiċi fil-metafażi, idealment fl-istess tip ta' ċellola u protokoll b'sensittività komparabbli, jista' jkun siewi wkoll sabiex jiġi stabbilit jekk il-mikronukleji humiex dovuti għal tkissir tal-kromożomi (filwaqt li jkun magħruf li telf ta' kromożomi ma jkunx identifikat fit-test tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Analiżi

Il-lametti kollha, inklużi dawk tas-solvent u l-kontrolli mhux ittrattati (jekk użati) u pożittivi, għandhom ikunu kodifikati b'mod indipendenti qabel l-analiżi bil-mikroskopju ta' frekwenzi tal-mikronukleji. Għandhom jintużaw tekniki xierqa sabiex jiġi kkontrollat kwalunkwe preġudizzju jew deriva meta tintuża sistema tal-punteġġ awtomatizzata, pereżempju, ċitometrija tal-fluss, ċitometrija ta' skennjar bil-laser jew analiżi tal-immaġnijiet. Indipendentement mill-pjattaforma awtomatizzata li tintuża sabiex jiġu nnumerati l-mikronukleji, is-CBPI, l-RI, l-RPD jew l-RICC għandhom jiġu vvalutati b'mod parallel.

F'kulturi ttrattati biċ-ċitoB, il-frekwenzi tal-mikronukleji għandhom jiġu analizzati f'tal-inqas 2 000 ċellola binukleata għal kull konċentrazzjoni u kontroll (83), maqsumin indaqs bejn ir-repliki, jekk jintużaw repliki. Fil-każ ta' kulturi waħedhom għal kull doża (ara l-paragrafu 28), għandhom jingħaddu tal-inqas 2 000 ċellola binukleata għal kull kultura (83) f'din il-kultura waħedha. Jekk għall-għoti tal-punti f'kull konċentrazzjoni jkunu disponibbli sostanzjalment inqas minn 1 000 ċellola binukleata għal kull kultura (għal kulturi duplikati), jew 2 000 (għal kultura singola), u jekk ma tiġi osservata ebda żieda sinifikanti fil-mikronukleji, it-test għandu jiġi ripetut bl-użu ta' aktar ċelloli, jew f'konċentrazzjonijiet inqas ċitotossiċi, skont xi jkun l-aktar xieraq. Wieħed għandu

▼M7

joqgħod attent li ma jgħoddx ċelloli binukleati b'forom irregolari jew meta ż-żewġ nukleji jkunu jvarjaw ħafna fid-daqs. Barra minn hekk, iċ-ċelloli binukleati ma għandhomx jitħalltu ma' ċelloli multinukelati li ma nfirxux wisq. Ċelloli li fihom iktar minn żewġ nukleji ewlenin ma għandhomx jiġu analizzati għal mikronukleji, peress li l-frekwenza tal-mikronukleu bażi tista' tkun ogħla f'dawn iċ-ċelloli (84). L-għadd ta' ċelloli mikronukleati huwa aċċettabbli jekk jintwera li s-sustanza kimika tat-test tinterferixxi mal-attività ta' ċitoB. Test ripetut mingħajr ĊitoB jista' jkun siewi f'dawn il-każijiet. L-għadd ta' ċelloli mononukleati minbarra ċ-ċelloli binukleati jista' jipprovdi informazzjoni siewja (85) (86), iżda mhuwiex obbligatorju.

F'linji ta' ċelloli ttestjati mingħajr trattament b'ċitoB, il-mikronukleji għandhom jingħaddu f'tal-inqas 2 000 ċellola għal kull konċentrazzjoni tat-test u kontroll (83), maqsumin indaqs bejn ir-repliki, jekk jintużaw repliki. Meta jintużaw kulturi waħedhom għal kull konċentrazzjoni (ara l-paragrafu 28), għandhom jingħaddu tal-inqas 2 000 ċellola għal kull kultura f'din il-kultura waħedha. Jekk għall-għoti tal-punti f'kull konċentrazzjoni jkunu disponibbli sostanzjalment inqas minn 1 000 ċellola għal kull kultura (għal kulturi duplikati), jew 2 000 (għal kultura singola), u jekk ma tiġi osservata ebda żieda sinifikanti fil-mikronukleji, it-test għandu jiġi ripetut bl-użu ta' aktar ċelloli, jew f'konċentrazzjonijiet inqas ċitotossiċi, skont xi jkun l-aktar xieraq.

Meta tintuża ċ-ċitoB, għandhom jiġu stabbiliti CBPI jew RI sabiex tiġi vvalutata l-proliferazzjoni taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 2) bl-użu ta' mill-inqas 500 ċellola għal kull kultura. Meta t-trattamenti jitwettqu fin-nuqqas ta' ċitoB, huwa essenzjali li tiġi pprovduta evidenza li ċ-ċelloli fil-kultura nqasmu, kif diskuss fil-paragrafi 24-28.

Il-profiċjenza tal-laboratorju

Sabiex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza bl-assaġġ qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi kimiċi pożittivi ta' referenza li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti (tal-inqas waħda b'attivazzjoni metabolika u waħda mingħajr, u waħda li taġixxi permezz ta' mekkaniżmu anewġeniku, u magħżula mis-sustanzi kimiċi elenkati fit-Tabella 1) u bosta kontrolli negattivi (inklużi kulturi mhux ittrattati u bosta solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontroll pożittiv u negattiv reazzjonijiet għandhom ikunu konsistenti mat-tagħrif. Dan mhuwiex applikabbli għal laboratorju li għandhom esperjenza, jiġifieri li għandhom database storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 49 sa 52.

Għandha tiġi investigata firxa ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv (ara t-Tabella 1) bi trattamenti qosra u twal fin-nuqqas ta' attivazzjoni metabolika, u anki bi trattament qasir fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, sabiex tintwera l-ħila li jinqabdu sustanzi kimiċi klastoġeniċi u anewġeniċi u tiġi stabbilita l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u jintwera li l-proċeduri tal-għadd huma xierqa (l-analiżi viżwali bil-mikroskopju, iċ-ċitometrija tal-fluss, iċ-ċitometrija ta' skennjar bil-laser jew l-analiżi tal-immaġnijiet). Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi magħżulin sabiex jingħataw żidiet riproduċibbli u marbutin mal-konċentrazzjoni fuq l-isfond sabiex jintwerew is-sensittività u l-firxa dinamika tas-sistema tat-test.

Dejta storika tal-kontroll

Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv,

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv (mhux ittrattat, solvent).

Meta għall-ewwel tinkiseb id-dejta għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu konsistenti mad-dejta tal-kontroll negattiv ippubblikata, meta tkun teżisti. Peress li tiżdied iktar dejta sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (87) (88). Id-database storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-inqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (88)), sabiex jidentifikaw kemm hija

▼M7

varjabbli d-dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u sabiex juru li l-metodoloġija hija "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (83). Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inklużjoni u l-esklużjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (87).

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tad-dejta mad-databases tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll.

Id-dejta tal-kontroll negattiv għandha tikkonsisti fl-inċidenza taċ-ċelloli mikronukleati minn kultura waħedha jew is-somma tal-kulturi ta' replika kif deskritti fil-paragrafu 28. Idealment, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (87) (88). Meta d-dejta tal-kontroll negattiv parallel toħroġ mil-limiti ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll diment li din id-dejta ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 50) u hemm evidenza ta' nuqqas ta' żball tekniku jew uman.

DEJTA U RAPPORTAR

Preżentazzjoni tar-riżultati

Jekk tintuża t-teknika ta' mblokkar taċ-ċitokineżi, huma biss il-frekwenzi taċ-ċelloli binukleati b'mikronukleji (indipendenti mill-għadd ta' mikronukleji għal kull ċellola) li għandhom jintużaw fl-evalwazzjoni tal-induzzjoni tal-mikronukleji. L-għadd tan-numri ta' ċelloli b'mikronukleu wieħed, tnejn jew iktar jista' jiġi rrapportat għalih u jista' jipprovdi informazzjoni siewja, iżda mhuwiex obbligatorju.

Għandhom jiġu stabbiliti miżuri simultanji ta' ċitotossiċità u/jew ċitostażi għall-kulturi ttrattati, tal-kontroll pożittiv u negattiv kollha (16). Is-CBPI jew l-RI għandhom jiġu kkalkolati għall-kulturi kollha ttrattati u ta' kontroll bħala kejl tad-dewmien taċ-ċiklu taċ-ċelloli meta jintuża l-metodu ta' mblokkar taċ-ċitokineżi. Fin-nuqqas ta' ċitoB, għandhom jintużaw l-RPD jew l-RICC (ara l-Appendiċi 2).

Għandha tiġi pprovduta dejta dwar il-kultura individwali. Barra minn hekk, id-dejta kollha għandha tinġabar taħt forma ta' tabella.

Kriterji ta' Aċċettabilità

L-aċċettazzjoni ta' test hija bbażata fuq il-kriterji li ġejjin:

— Il-kontroll negattiv parallel jitqies aċċettabbli għaż-żieda fid-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 50.

— Il-kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 50) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fid-database storika tal-kontroll pożittiv tal-laboratorju u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv parallel.

— Il-kriterji ta' proliferazzjoni taċ-ċelloli fil-kontroll tas-solventi għandhom ikunu ssodisfati (paragrafi 25-27).

— Il-kundizzjonijiet sperimentali kollha ġew ittestjati sakemm wieħed ma rriżultax f'riżultati pożittivi (il-paragrafi 36-40).

— Hemm numru adegwat ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet li huma analizzabbli (paragrafi 28 u -46).

▼M7

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 24-31.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati (ara l-paragrafi 36-39):

— tal-inqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel (89)

— żieda hija marbuta mad-doża f'tal-inqas kundizzjoni sperimentali waħda meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi (ara l-paragrafu 28)

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson; ara l-paragrafu 52).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi tkissir tal-kromożomi u/jew gwadann jew telf f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mit-tagħrif (90) (91) (92).

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali analizzati kollha (ara l-paragrafi 36-39):

— l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel,

— ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

— ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson; ara l-paragrafu 52).

Is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi tkissir tal-kromożomi u/jew gwadann jew telf f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mit-tagħrif (90) (91) (92).

Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

F'każ li r-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq u/jew sabiex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-dejta għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. L-ikklassifikar ta' ċelloli addizzjonali (fejn xieraq) jew it-twettiq ta' esperiment ripetut possibilment bl-użu ta' kundizzjonijiet modifikati tal-esperiment (eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet, kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika oħrajn [jiġifieri konċentrazzjoni S9 jew oriġini S9]) jista' jkun siewi.

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' dejta mhuwiex sejjer jippermetti li tinħareġ konklużjoni pożittiva jew negattiva u, għalhekk, sejjer jiġi konklużż bħala ekwivoku.

Sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu mikronukleji fit-test MNvit jistgħu jagħmlu dan minħabba li jinduċu ksur tal-kromożomi, telf tal-kromożomi jew taħlita tat-tnejn. Jistgħu jintużaw analiżi ulterjuri li tuża antikorpi antikinetoċoru, sondi *in situ* speċifiċi għaċ-ċentromeri, jew metodi oħrajn sabiex jiġi stabbilit jekk il-mekkaniżmu ta' induzzjoni tal-mikronukleji huwiex dovut għal attività klastoġenika u/jew anewġenika.

▼M7

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— ir-reattività tas-sustanzi kimiċi tat-test mas-solvent/mezz jew il-media tal-kultura taċ-ċelloli;

— is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, l-ożmolalità u l-preċipitat fil-medium tal-kultura li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solventi:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;

— il-perċentwal ta' solvent fil-medium tal-kultura finali

Ċelloli:

— it-tip u s-sors taċ-ċelloli użati;

— l-adattabilità tat-tip ta' ċelloli użati;

— in-nuqqas ta' mikoplażma, fil-każ ta' linji ta' ċelloli;

— għal-linji ta' ċelloli, informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċellola jew l-indiċi tal-proliferazzjoni;

— meta jintużaw linfoċiti, is-sess tad-donaturi tad-demm, l-età u kwalunkwe informazzjoni rilevanti dwar id-donatur, id-demm sħiħ jew il-linfoċiti separati, il-mitoġenu użat;

— iż-żmien normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli (kontroll negattiv);

— in-numru ta' passaġġi, jekk disponibbli, għal-linji ta' ċelloli;

— il-metodi għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli, għal-linji ta' ċelloli;

— in-numru modali ta' kromożomi, għal-linji ta' ċelloli.

▼M7

Kundizzjonijiet tat-test:

— l-identità tas-sustanza li timblokka ċ-ċitokineżi (eż. ċitoB), jekk tintuża, u l-konċentrazzjoni tagħha, flimkien mad-durata tal-esponiment taċ-ċelloli;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tal-kultura (eż. μg jew mg/mL jew mM tal-medium tal-kultura);

— ir-raġuni għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u l-għadd ta' kulturi, inkluża dejta dwar iċ-ċitotossiċità u l-limitazzjonijiet tas-solubilità;

— il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni tas-CO_2 jekk applikabbli, il-livell ta' umdità;

— il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) tas-solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tal-kultura;

— it-temperatura u l-ħin tal-inkubazzjoni;

— id-durata tat-trattament;

— il-ħin tal-ġbir wara t-trattament;

— id-densità taċ-ċelloli waqt l-injettar, jekk applikabbli;

— it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-taħlita ta' S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' taħlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tal-kultura finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9 (eż. l-attività enzimatika, l-isterilità, il-kapaċità metabolika);

— is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali, il-kundizzjonijiet u d-durati tat-trattament u l-perjodi ta' rkupru;

— il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti u t-teknika użata għat-tilwin;

— il-kriterji għall-għadd taċ-ċelloli mikronukelati (għażla taċ-ċelloli analizzabbli u l-identifikazzjoni tal-mikronukleu);

— l-għadd ta' ċelloli analizzati;

— il-metodi għall-kejl taċ-ċitotossiċità;

— kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossiċità u l-metodu użat;

— il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

— il-metodu/i tal-analiżi statistika użat(i);

— il-metodi, bħall-użu ta' antikorp antikinetoċoru jew sondi speċifiċi panċentromeriċi, sabiex jiġi kkaratterizat jekk mikronukleu fihx kromożomi sħaħ jew frammentati, jekk applikabbli;

— il-metodi użati sabiex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità u l-preċipitazzjoni.

Ir-riżultati:

— definizzjoni taċ-ċelloli aċċettabbli għall-analiżi;

— fin-nuqqas ta' ċitoB, l-għadd ta' ċelloli ttrattati u l-għadd ta' ċelloli miġburin għal kull kultura fil-każ tal-linji ta' ċelloli;

▼M7

— il-kejl taċ-ċitotossiċità użat, eż. CBPI jew RI fil-każ ta' metodu ta' mblokkar taċ-ċitokineżi; RICC jew RPD meta ma jintużawx metodi ta' mblokkar taċ-ċitokineżi; osservazzjonijiet oħrajn jekk jeżistu (eż. konfluwenza taċ-ċelloli, apoptożi, nekrożi, għadd tal-metafaži, frekwenza ta' ċelloli binukleati);

— is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-ħin tad-determinazzjoni;

— dejta dwar il-pH u l-ożmolalità tal-medium tat-trattament, jekk ikun stabbilit;

— id-distribuzzjoni taċ-ċelloli mononukleati, binukleati u multinukleati jekk jintuża l-metodu ta' mblokkar taċ-ċitokineżi;

— l-għadd ta' ċelloli b'mikronukleji mogħtija separatament għal kull kultura tat-trattament u tal-kontroll, u jekk hux minn ċelloli binukleati jew mononukleati, fejn xieraq,

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— id-dejta tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventI) parallel;

— id-dejta tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv, b'meded, medji u devjazzjonijiet standard u limiti ta' kontroll ta' 95 % għad-distribuzzjoni, kif ukoll in-numru ta' dejta;

— analiżi statistika; il-valuri p, jekk ikun hemm.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjonijiet.

TAGĦRIF

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, pp. 9-20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, pp. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, pp. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) Il-Kapitolu 10 ta' dan l-Annes*: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*,.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼**M7**

(26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, pp. 183-190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, pp. 55-71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, pp. 28-36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. Il-25 laqgħa tal-ESAC, 16-17 ta' Novembru 2006, Disponibbli fuq: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponibbli fuq: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(44) Long, L.H. *et al*. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. **37/1**, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(57) Ong, T.-m. *et al*. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

▼M7

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976). (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, pp. 51-59.

(61) UNEP (2001). Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes, Programm tan-Nazzjonijiet Uniti għall-Ambjent (UNEP). Disponibbli fuq: http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, pp. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research,* 564, 97-100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, pp. 169-184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.

(73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponibbli fuq talba.

▼M7

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280–286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). "*In vitro* micronucleus test", in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al*. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Anewġenu: kwalunkwe sustanza kimika jew proċess li, meta jinteraġġixxu mal-komponenti tal-apparat taċ-ċiklu tad-diviżjoni taċ-ċellola mitotika u mejotika, iwasslu għal anewplojdija f'ċelloli jew organiżmi.

Anewplojdija: kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Apoptożi: mewta programmata taċ-ċelloli kkaratterizzata minn sensiela ta' passi li jwasslu għad-diżintegrazzjoni taċ-ċelloli fil-partikoli mwaħħlin mal-membrana li mbagħad jiġu eliminati permezz ta' fagoċitożi jew permezz ta' tixrid.

Proliferazzjoni taċ-ċelloli: iż-żieda fl-għadd ta' ċelloli bħala riżultat ta' diviżjoni mitotika taċ-ċelloli.

Ċentromeru: ir-reġjun tad-DNA ta' kromożomu wieħed fejn iż-żewġ kromatidi jinżammu flimkien u li fuqu hemm imwaħħlin ġenb ma' ġenb iż-żewġ kinetokori.

Sustanza kimika: sustanza jew taħlita.

Konċentrazzjonijiet: tirreferi għal konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tal-kultura.

Klastoġenu: kwalunkwe sustanza kimika jew avveniment li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi f'popolazzjonijiet ta' ċelloli jew organiżmi ewkarjotiċi.

Ċitokineżi: il-proċess ta' diviżjoni taċ-ċelloli minnufih wara mitożi sabiex jifforma żewġ ċelloli żgħar, fejn kull waħda jkun fiha nukleu wieħed.

Indiċi tal-Proliferazzjoni b'Imblokkar taċ-Ċitokineżi (CBPI): il-proporzjon ta' ċelloli tat-tieni diviżjoni fil-popolazzjoni ttrattata meta mqabbla mal-kontroll mhux ittrattat (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Ċitostażi: inibizzjoni tat-tkabbir taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Ċitotossiċità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar li jsiru fil-preżenza ta' ċitokalażina B, iċ-ċitotossiċità tiġi identifikata bħala tnaqqis fl-indiċi tal-proliferazzjoni b'imblokkatur taċ-ċitokineżi (CBPI) jew l-Indiċi tar-Replikazzjoni (RI) taċ-ċelloli ttrattati meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 26 u l-Appendiċi 2)

Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar imwettqin fin-nuqqas ta' ċitokalażina B, iċ-ċitotossiċità hija identifikata bħala tnaqqis fl-irduppjar relattiv tal-popolazzjoni (RPD) jew iż-żieda relattiva fl-għadd taċ-ċelloli (RICC) taċ-ċelloli ttrattati meta mqabblin mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 27 u l-Appendiċi 2).

Ġenotossiċi: terminu ġenerali li jkopri t-tipi kollha ħsara lid-DNA jew lill-kromożomi, inklużi ksur, tħassiriet, addotti, modifiki u konnessjonijiet tan-nukleotidi, riarranġamenti, mutazzjonijiet tal-ġeni, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew ħsara fil-kromożomi stabbli.

Ċelloli fl-interfaži: ċelloli li mhumiex fl-istadju mitotiku.

Kinetoċoru: struttura li fiha l-proteina li tgħaqqad fiċ-ċentromeru ta' kromożoma li magħha jaqbdu l-fibri rqaq matul id-diviżjoni taċ-ċelloli, sabiex b'hekk ikun hemm il-moviment ordinat ta' kromożomi dixxendenti għall-poli taċ-ċelloli dixxendenti.

▼M7

Mikronukleji: nukleji żgħar, separati minn u addizzjonali għan-nukleji ewlenin ta' ċelloli, prodotti waqt it-telofaži ta' mitoži jew mejoži permezz frammenti ta' kromożomi li jibqa' jew kromożomi sħaħ.

Mitoži: diviżjoni tan-nukleu taċ-ċelloli li normalment jinqasam fi profaži, prometafaži, metafaži, anafaži u telofaži.

Indiċi mitotiku: il-proporzjon ta' ċelloli fil-metafaži diviż bin-numru totali ta' ċelloli osservati f'popolazzjoni ta' ċelloli; indikazzjoni tal-livell ta' profilerazzjoni taċ-ċelloli ta' dik il-popolazzjoni.

Mutaġeniku: jipproduċi bidla ereditarja ta' sekwenza(i) tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Nondisġunzjoni: nuqqas min-naħa tal-kromatidi f'pari milli jinfirdu u jissegregaw ruħhom sew sabiex jiżviluppaw ċelloli dixxendenti, u dan jirriżulta f'ċelloli żgħar b'għadd anormali ta' kromożomi.

Status p53: il-proteina p53 hija involuta fir-regolamentazzjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli, l-apoptożi u t-tiswija tad-DNA. Ċelloli b'defiċjenza fil-proteina p53 funzjonali, li mhux kapaċi jinibixxu ċ-ċiklu taċ-ċelloli jew jelimintaw iċ-ċelloli bil-ħsara b'apoptożi jew mekkaniżmi oħrajn (eż. induzzjoni tat-tiswija tad-DNA) marbutin mal-funzjonijiet p53 f'rispons għall-ħsara fid-DNA, teoretikament għandhom ikunu iktar suxxettibbli għal mutazzjonijiet tal-ġeni jew aberrazzjonijiet kromożomiċi.

Poliplojdija: aberrazzjonijiet kromożomiċi numeriċi f'ċelloli jew organiżmi li jinvolvu sett(ijiet) sħiħ(sħaħ) ta' kromożomi, meta mqabbla ma' kromożoma individwali jew kromożomi (anewplojdija).

Indiċi tal-Proliferazzjoni (PI): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax iċ-ċitoB (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax iċ-ċitoB (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax iċ-ċitoB (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Indiċi tar-Replikazzjoni (RI): il-proporzjon taċ-ċikli tad-diviżjoni taċ-ċelloli mwettqa f'kultura ttrattata, fir-rigward tal-kontroll mhux trattat, matul il-perjodu ta' esponiment u l-irkupru (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Frazzjoni tal-fwied S9: supernatant ta' omoġenat tal-fwied wara ċentrifugazzjoni ta' 9 000g, jiġifieri estratt minn fwied mhux ipproċessat.

Taħlita ta' F9: taħlita tal-frazzjoni tal-fwied S9 u l-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metaboliċi.

Kontrolli tas-solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kulturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent waħdu użat sabiex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Kontroll mhux ittrattat: kulturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri ebda sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu pproċessati fl-istess ħin bl-istess mod bħall-kulturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

▼M7

Appendiċi 2

FORMOLI GĦALL-VALUTAZZJONI TAĊ-ĊITOTOSSIĊITÀ

Meta tintuża ċ-ċitoB, l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità għandha tkun ibbażata fuq l-**Indiċi tal-Profilerazzjoni b'Imblokkar taċ-Ċitokineżi (CBPI)** jew l-**Indiċi tar-Replikazzjoni (RI)** (17) (69). Is-CBPI tindika l-għadd medju ta' nukleji għal kull ċellola, u tista' tintuża sabiex tiġi kkalkolata l-proliferazzjoni taċ-ċelloli. L-RI tindika l-għadd relattiv ta' ċikli taċ-ċelloli għal kull ċellola matul il-perjodu ta' esponiment għaċ-ċitoB f'kulturi ttrattati meta mqabblin ma' kulturi tal-kontroll u tista' tintuża sabiex jiġi kkalkolat il- % ta' ċitostaži:

$$\% \text{ Cytostasis} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

Kif ukoll:

T = kultura tat-trattament bis-sustanza kimika tat-test

C = kultura tal-kontroll

Fejn:

$$CBPI = \frac{((\text{No.mononucleate cells}) + (2 \times \text{No. binucleate cells}) + (3 \times \text{No.multinucleate cells}))}{(\text{Total number of cells})}$$

Għaldaqstant, CBPI ta' 1 (iċ-ċelloli kollha huma mononukleati) hija ekwivalenti għal ċitostaži ta' 100 %.

Ċitostaži = 100-RI

$$RI = \frac{((\text{No. binucleate cells}) + (2 \times \text{No.multinucleate cells}))/(\text{Total number of cells})_T}{((\text{No. binucleate cells}) + (2 \times \text{No.multinucleate cells}))/(\text{Total number of cells})_C} \times 100$$

T = kulturi ttrattati

C = kulturi tal-kontroll

B'hekk, RI ta' 53 % ifisser li, meta mqabbel mal-għadd ta' ċelloli li jkunu nqasmu biex jiffurmaw ċelloli binukleati u multinukleati fil-kultura ta' kontroll, 53 % biss ta' dan l-għadd ġew diviżi fil-kultura trattata, jiġifieri ċitostaži ta' 47 %.

Meta ma tintużax ċitoB, hija rrakkomandata evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità fuq il-baži taż-**Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC)** jew fuq l-**Irduppjar tal-Popolazzjoni Relattiva (RPD)** (69), minħabba li t-tnejn iqisu l-proporzjon tal-popolazzjoni taċ-ċelloli li tkun inqasmet.

$$\mathbf{RICC(\%)} = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{Increase in numbers of cells in control cultures}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD(\%)} = \frac{(\text{No.of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No.of population doublings in control cultures})} \times 100$$

fejn:

Irduppjar tal-Popolazzjoni = [log (Numru ta' ċelloli wara t-trattament ÷ Numru ta' ċelloli inizjali)] ÷ log 2

B'hekk, RICC, jew RPD ta' 53 % jindikaw 47 % ċitotossiċità/ċitostaži.

▼**M7**

Billi jintuża **Indiċi tal-Proliferazzjoni (PI)**, iċ-ċitotossiċità tista' tiġi vvalutata pemrezz tal-għadd tan-numru ta' kloni li jikkonsistu f'ċellola 1 (cl1), 2 ċelloli (cl2), 3 sa 4 ċelloli (cl4) u 5 sa 8 ċelloli (cl8).

$$\mathrm{PI} = \frac{((1 \times \mathrm{cl1}) + (2 \times \mathrm{cl2}) + (3 \times \mathrm{cl4}) + (4 \times \mathrm{cl8}))}{(\mathrm{cl1} + \mathrm{cl2} + \mathrm{cl4} + \mathrm{cl8})}$$

Il-PI ntuża bħala parametru siewi u affidabbli taċ-ċitotossiċità anki għal linji ta' ċelloli kkulturati *in vitro* fin-nuqqas ta' ċitoB (35) (36) (37) (38) u jista' jitqies bħala parametru addizzjonali siewi.

Fi kwalunkwe każ, l-għadd ta' ċelloli qabel it-trattament għandu jkun l-istess għal kulturi tat-trattament u tal-kontroll negattiv.

Filwaqt li l-RCC (jiġifieri n-Numru ta' ċelloli f'kulturi tat-trattament/ Numru ta' ċelloli f'kulturi tal-kontroll) intuża bħala parametru taċ-ċitotossiċità fl-imgħoddi, illum ma għadux rakkomandat għaliex jista' jissottovaluta ċ-ċitotossiċità

Meta jintużaw sistemi tal-klassifikazzjoni awtomatizzati, pereżempju, ċitometrija tal-fluss, ċitometrija ta' skennjar bil-laser jew analiżi tal-immaġnijiet, in-numru ta' ċelloli fil-formula jista' jiġi sostitwit bin-numru ta' nukleji.

Fil-kulturi tal-kontroll negattiv, l-irduppjar tal-popolazzjoni jew l-indiċi tar-replikazzjoni għandu jkun kompatibbli mar-rekwiżit li jittieħed kampjun taċ-ċelloli wara t-trattament fi żmien ekwivalenti għal madwar darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli.

▼M3

B.50. **SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODI TAL-LIMFA LOKALI: DA**

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. L-ewwel Metodu tat-Test (TM) (B.42) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali (Local Lymph Node Assay — LLNA; Linja gwida 429 tat-Test tal-OECD) ġie rivedut (1). Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u analiżi tax-xogħol assoċjat ġew ippubblikati (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Fl-LLNA, tintuża t-timidina jew jojdu radjoisotopiku biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti u għaldaqstant, l-analiżi għandha użu limitat fejn l-akkwiżizzjoni, l-użu jew l-eliminazzjoni tar-radjuattività huma problematiċi. L-LLNA: DA (żviluppat minn Daicel Chemical Industries, Ltd.) huwa modifikazzjoni mhux radjuattiva għal-LLNA, li tikkwantifika l-kontenut tat-trifosfat tal-adenożina (adenosine triphosphate, ATP) permezz ta' bijoluminexxenza bħala indikatur tal-proliferazzjoni tal-limfoċiti. Il-metodu ta' ttestjar LLNA: DA ġie vvalidat u analizzat u rakkomandat minn panil internazzjonali ta' analiżi minn pari bħala utli għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi sensitizzanti u mhux sensitizzanti, b'ċerti limitazzjonijiet (10) (11) (12) (13). Dan it-TM huwa mfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness u Linja Gwida 406 tat-Test OECD jużaw fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni tal-fniek tal-Indi u t-test Buehler (14). L-LLNA (Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 429 tat-Test OECD) u ż-żewġ modifikazzjonijiet mhux radjuattivi, LLNA: DA (Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 A tat-Test OECD) u LLNA: BrdU-ELISA (Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 B tat-Test OECD), kollha jipprovdu vantaġġ fuq it-testijiet tal-fniek tal-Indi f'B.6 u fil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14) f'termini ta' tnaqqis u rfinar tal-użu tal-annimali.

2. B'mod simili għal-LLNA, l-LLNA: DA tistudja l-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva adattata għall-valutazzjoni tad-doża u r-reazzjoni. Barra minn hekk, abilità li jinkixfu sensitizzaturi tal-ġilda mingħajr il-ħtieġa li tintuża radjutikketta għad-DNA telimina l-potenzjal għal esponiment fuq il-post tax-xogħol għal kwistjonijiet ta' radjuattività u ta' rimi ta' skart. Min-naħa tiegħu, dan jista' jippermetti għall-użu miżjud ta' ġrieden għall-individwazzjoni ta' sensitizzaturi tal-ġilda, li jnaqqas ulterjorment l-użu tal-fniek tal-Indi għal testijiet għal potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD) (14).

DEFINIZZJONIJIET

3. Definizzjonijiet użati huma pprovduti f'Appendiċi 1.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA: DA huwa metodu tal-LLNA modifikat għall-identifikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni fil-ġilda, b'limitazzjonijiet speċifiċi. Dan mhux neċessarjament jimplika li fil-każijiet kollha, l-LLNA: DA għandha tintuża minflok it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-test OECD) (14), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma (10) (11). Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta'

▼M3

kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA: DA huwiex adattat għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA: DA [ara paragrafu 5]) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA: DA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Huwa għandu, madankollu, il-potenzjal li jnaqqas l-għadd ta' annimali meħtieġa għal dan il-għan meta mqabbel mat-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (B.6; Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (14). Barra minn hekk, l-LLNA: DA toffri rfinar sostanzjali (inqas uġigħ u dwejjaq) fil-mod kif l-annimali jintużaw għal provi ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku, minħabba li b'differenza mill-B.6 u mil-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD, l-LLNA: DA ma jeħtieġx li reazzjonijiet ta' sensittività eċċessiva dermali indotti mill-isfida jiġu indikati. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA: DA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14), hemm xi limitazzjonijiet li jistgħu jeħtieġu l-użu ta' B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (eż. l-ittestjar ta' ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal xi sustanzi tat-tip tensjoattivi] (6) (1 u l-Kapitolu B.42 f'dan l-Anness), solubilità tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (16) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14)). Limitazzjonijiet li ġew identifikati għal-LLNA (1, u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness) ġew rakkomandati sabiex japplikaw ukoll għal-LLNA: DA (10). Barra minn hekk, l-użu tal-LLNA: DA ma jkunx xieraq għal sustanzi ta' ttestjar li jaffettwaw il-livelli tal-ATP (eż. sustanzi li jiffunzjonaw bħala inibituri tal-ATP) jew dawk li jaffettwaw il-kejl preċiż ta' ATP intraċellolari (eż. il-preżenza ta' enzimi ta' degradazzjoni tal-ATP, il-preżenza ta' ATP ekstraċellolari fin-nodi tal-limfa). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA: DA għandu jkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi li jistgħu jinterferixxu mal-eżattezza tal-LLNA: DA. Barra minn hekk, għandha tingħata konsiderazzjoni għall-possibilità ta' riżulatati pożittivi tal-limitu meta jinkisbu valuri ta' Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI) ta' bejn 1,8 u 2,5 (ara l-paragrafi 31-32). Dan huwa bbażat fuq il-bażi ta' dejta ta' validazzjoni ta' 44 sustanza li jużaw SI ≥ 1,8 (ara paragrafu 6) li għalihom, l-LLNA: DA identifika b'mod korrett it-32 sensitizzatur tal-LLNA, iżda b'mod inkorrett identifika tlieta minn 12-il nonsensitizzaturi tal-LLNA b'valuri tal-SI ta' bejn 1,8 u 2,5 (jiġifieri linja tal-limitu pożittiva) (10). Madankollu, minħabba li l-istess sett ta' dejta ntuża għall-issettjar tal-valuri SI u għall-kalkolu tal-karatteristiċi ta' tbassir tat-test, ir-riżultati ddikjarati jistgħu jkunu stima eċċessiva tal-karatteristiċi ta' tbassir reali.

PRINĊIPJU TA' DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA: DA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju,

▼M3

imsejjaħ l-SI, jiġi stabbilit, u għandu jkun ≥ 1,8 qabel ma tkun meħtieġa evalwazzjoni ulterjuri tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu tal-kejl tal-kontenut ta' ATP b'bijoluminexxenza (magħrufa li tikkorrelata mal-għadd ta' ċelloli ħajjin) (17) sabiex jiġi indikat għadd miżjud ta' ċelloli ta' proliferazzjoni fin-nodi tal-limfa awrikulari li jnixxu (18) (19). Il-metodu bijoluminexxenti juża l-enzima luċiferaži biex jikkatalizza l-formazzjoni tad-dawl minn ATP u luċiferin skont ir-reazzjoni li ġejja:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Dawl$$

L-intensità tad-dawl emess hija relatata b'mod lineari mal-konċentrazzjoni tal-ATP u hija mkejla permezz ta' luminometru. L-analiżi ta' luċiferin-luċiferaži hija metodu sensittiv għall-kwantifikazzjoni tal-ATP użata f'firxa wiesgħa ta' applikazzjonijiet (20).

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi tal-għażla għal dan it-test. Studji ta' validazzjoni għal-LLNA: DA twettqu esklussivament bir-razza CBA/J li għaldaqstant hija kkunsidrata r-razza ppreferuta (12) (13). Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħar, li huma nulliparuži u mhumiex tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 ġimgħat u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA: DA.

Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (21), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 %, għajr waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel il-bidu tat-trattament, l-annimali kollha jiġu eżaminati sabiex ikun żgurat li huma ma jkollhom l-ebda feriti osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

▼M3

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli għal sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex din turi l-kompetenza tal-laboratorju biex iwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Xi awtoritajiet regolatorji jeħtieġu wkoll PC għal kull studju u għaldaqstant, l-utenti huma mħeġġa jikkonsultaw mal-awtoritajiet rilevanti qabel iwettqu l-LLNA: DA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu tali rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandha tipproduċi reazzjoni tal-LLNA: DA pożittiva f'livell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 1,8 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni hija riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 10 ikun jitqies eċċessiv). PC ippreferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Numru tal-Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) u 25 % ewġenol (numru tal-CAS 97-53-0,) fl-aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Filwaqt li l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA: DA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA: DA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storika stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA: DA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC f'mill-inqas 10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena waħda).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA: DA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom jiġu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati negattivi ta' studju ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodika aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodika mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubjuži. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom ikunu kkunsidrati b'attenzjoni meta jkun deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (22).

▼M3

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat f'mezz li huwa magħruf li jeliċita reazzjoni konsistenti (eż. l-aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom it-testijiet b'mezz mhux regolari (formulazzjoni klinika/kimikament rilevanti) ikunu meħtieġa wkoll (23). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanju.

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex jinstab il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

— xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,

— karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,

— dejta ta' appoġġ mil-LLNA: DA,

— dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli tad-doża

17. Għal kull grupp ta' dożi għandhom jintużaw tal-inqas erba' annimali, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u PC (simultanja jew reċenti, ibbażata fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dożi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Apparti n-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom jiġu mmaniġġjati u trattati b'mod identiku bħall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi (2) u (24). Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (24) (25). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimmizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), N,N-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (6) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet, jista' jkun meħtieġ li jsir użu minn solvent kimikament rilevanti jew mill-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test hija kkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi idrofiliċi jkunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi likwidi għalkollox għandhom jiġu evitati.

▼M3

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara paragrafu 33). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tinġabar dejta dwar annimali individwali (22). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Ġbir regolari ta' dejta dwar annimali individwali jipprovdi vantaġġ mil-lat tal-benesseri tal-annimal billi jevita ttestjar doppju li jkun meħtieġ li kieku r-riżultati tas-sustanza tat-test li tkun inġabret oriġinarjament b'xi mod (eż. permezz ta' dejta miġbura dwar l-annimali) kellhom jiġu kkunsidrati aktar tard mill-awtoritajiet regolatorji ma' rekwiżiti oħrajn (eż. dejta individwali dwar l-annimali).

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun stabbilita l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara paragrafu 18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi definit il-livell ta' doża xierqa li għandha tiġi ttestjata fl-LLNA: DA. L-iskop tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell tad-doża massima li għandha tintuża fl-istudju ewlieni tal-LLNA: DA, meta l-informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li tikkawża tossiċità sistemika (ara paragrafu 24) u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda (ara paragrafu 23) ma tkunx disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir taħt l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA: DA, ħlief għall-fatt li ma hemmx valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 8). Iż-żewġ widniet ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (25). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta' gejġ ta' ħxuna (eż. mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) f'Jum 1 (qabel id-doża), f'Jum 3 (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), f'Jum 7 (24 siegħa qabel it-tmiem) u f'Jum 8. Barra minn hekk, f'Jum 8, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥ 3 u/jew ħxuna tal-widna ta' ≥ 25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (26) (27). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA: DA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-Eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2

▼M3

Osservazzjoni	Punteġġ
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġjat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta' 25 % fil-ħxuna tal-widna (26) (27), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (67) (31) (69) (70) (71).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (35) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA: DA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispneja, nifs maqtugħ, u ħsejjes mill-pulmun (rales)), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' > 5 % fil-piż tal-ġisem minn Jum 1 sa Jum 8 u mortalità, għandhom jiġu kkunsidrati fl-evalwazzjoni. Annimali moribondi jew annimali li juru sinjali ta' uġigħ jew dieqa severa għandhom jinqatlu b'mod uman (36).

Skeda sperimentali tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda sperimentali tal-analiżi hija kif ġej:

— *Jum 1:* Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika soluzzjoni milwiema ta' 1 % sodju lauril sulfat (SLS) fuq il-parti ta' wara ta' kull widna billi tuża pinzell imbill fis-soluzzjoni ta' SLS sabiex tkopri d-dorsum ta' kull widna b'erba' jew ħames pinzellati. Siegħa wara t-trattament bl-SLS, applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11–15), fuq in-naħa ta' wara ta' kull widna.

— *Jiem 2, 3 u 7:* Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni ta' qabel it-trattament bis-sustanza milwiema ta' 1 % SLS u tas-sustanza tat-test imwettqa f'Jum 1.

— *Jiem 4, 5 u 6:* L-ebda trattament.

— *Jum 8:* Ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Bejn wieħed u ieħor 24 sa 30 siegħa wara l-bidu tal-applikazzjoni f'Jum 7, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' barra n-nodi limfatiċi awrikulari li jkunu qed inixxu minn kull widna tal-ġurdien u pproċessa separatament f'soluzzjoni ta' ilma bil-melħ ibbaferjata bil-fosfat (PBS) għal kull annimal. Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (22). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta' ġejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

▼M3

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Minn kull ġurdien, titħejja sospensjoni ta' ċellola singola ta' ċelloli tan-nodi limfatiċi (LNC — lymph node cells) maqtugħin bilateralment billi n-nodi limfatiċi jitpoġġew mgħaffġin bejn żewġ slajds tal-ħġieġ u tiġi applikata pressjoni ħafifa sabiex in-nodi jitgħaffġu. Wara li jiġi kkonfermat li t-tessut infirex irqiq, irqiq, issepara ż-żewġ slajds minn ma' xulxin. Issospendi t-tessut fuq iż-żewġ slajds fil-PBS billi żżomm kull slajd f'angolu fuq id-dixx Petri u filwaqt li tlaħlaħ b'PBS waqt li fl-istess ħin tqaxxar it-tessut mill-islajd bi scraper taċ-ċelloli. Barra minn hekk, in-nodi limfatiċi f'annimali NC huma żgħar, għalhekk operazzjoni attenta hija importanti sabiex ikun evitat kwalunkwe effett artifiċjali fuq il-valuri SI. Għandu jintuża volum total ta' 1 mL PBS għat-tlaħliħ taż-żewġ slajds. Is-sospensjoni tal-LNC fid-dixx Petri għandha tiġi omoġenizzata kemmxejn bl-iscraper taċ-ċelloli. Imbagħad jinġabar alikwott ta' 20 µL tas-sospensjoni tal-LNC b'mikropipetta, filwaqt li wieħed joqgħod attent li ma jiħux il-membrana li hija viżibbli għall-għajn, u sussegwentament jitħallat ma' 1,98 mL tal-PBS biex jagħti kampjun ta' 2 mL. Imbagħad jitħejja t-tieni kampjun ta' 2 mL, billi tintuża l-istess proċedura sabiex jitħejjew żewġ kampjuni għal kull annimal.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni ċellolari (kejl tal-kontenut tal-ATP tal-limfoċiti)

27. Żidiet fil-kontenut ta' ATP fin-nodi limfatiċi jitkejlu bil-metodu luċiferin/-luċiferaži li juża kit tal-kejl tal-ATP, li jkejjel il-bijoluminexxenza f'Unitajiet ta' Luminexxenza Relattiva (Relative Luminescence Units — RLU). Il-ħin tal-analiżi mill-ħin tal-qatla tal-annimal sal-kejl tal-kontenut ta' ATP għal kull annimal individwali għandu jinżamm uniformi, fi żmien bejn wieħed u ieħor 30 minuta minħabba li l-kontenut ta' ATP huwa meqjus li gradwalment jonqos mal-ħin wara l-qatla tal-annimal (12). B'hekk, is-serje ta' proċeduri mill-qtugħ tan-nodi limfatiċi awrikulari sal-kejl tal-ATP għandha titlesta fi żmien 20 minuta permezz tal-iskeda ta' żmien predeterminata li hija l-istess għal kull annimal. Il-luminexxenza tal-ATP għandha titkejjel f'kull kampjun ta' 2 mL sabiex jinġabar total ta' żewġ kejlijiet ta' ATP għal kull annimal. Il-luminexxenza tal-ATP medja tiġi mbagħad stabbilita u użata f'kalkoli sussegwenti (ara paragrafu 30).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

28. Kull ġurdien għandu jiġi osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjanijiet ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (36).

Piżijiet tal-ġisem

29. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

30. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI medja. L-SI jinkiseb billi wieħed jiddividi l-RLU/ġurdien medju f'kull grupp tas-sustanza tat-test, u l-grupp tal-PC, bl-RLU/ġurdien medju għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed.

▼M3

31. Il-proċess tad-deċiżjoni jqis riżultat bħala pożittiv meta SI ≥ 1,8 (10). Madankollu, il-qawwa tar-relazzjoni tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali (jiġifieri valur SI bejn 1,8 u 2,5) jiġix iddikjarat pożittiv (2) (3) (37).

32. Għal rispons pożittiv marġinali bejn SI ta' 1,8 u 2,5, l-utenti jistgħu jkunu jridu jikkunsidraw informazzjoni addizzjonali bħar-relazzjoni doża-reazzjoni, evidenza ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni eċċessiva, u fejn xieraq, sinifikat statistiku flimkien ma' valuri SI sabiex jiġi kkonfermat li tali riżultati huma pożittivi (10). Għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensititizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall f'parti oħra (4).

33. Il-ġbir ta' dejta fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti li ssir analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull valutazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari kontra tqabbil ta' kontroll ta' solvent simultanju/VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-valutazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ, ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi bi jew mingħajr ċerti punti ta' dejta (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

34. Id-dejta għandha tingħata fil-qosor f'għamla ta' tabella li turi l-valuri tal-RLU tal-annimal individwali, l-RLU medju tal-grupp/annimal, it-terminu ta' żball assoċjat tiegħu (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mas-solvent/grupp ta' kontroll tal-mezz simultanju.

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi kimiċi tat-test u ta' kontroll

— dejta tal-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott),

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, stabbilità, solubilità),

— jekk taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti,

Solvent/mezz

— dejta tal-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat),

— raġuni għall-għażla tal-mezz,

▼M3

Annimali tat-test

— is-sors tal-ġrieden tas-CBA,

— l-istatus mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf,

— l-għadd u l-età tal-annimali,

— is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.,

Kondizzjonijiet tat-test,

— is-sors, in-numru tal-lott u assigurazzjoni tal-kwalità tal-manifattur/dejta ta' kontroll tal-kwalità għall-kit tal-ATP,

— dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,

— raġuni għall-għażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),

— il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikat,

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),

— dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni,

— metodi ta' kejl tat-tossiċità,

— kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi,

— dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju,

Verifika tal-affidabilità:

— sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użati,

— PC simultanju u/jew storiku u dwar dejta negattiva simultanja (solvent/-mezz) għal-laboratorju li qed jagħmel it-test,

— jekk ma kinitx inkluża PC simultanja, id-data u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodika reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta tal-PC storika għal-laboratorju li tiġġustifika l-bażi għaliex ma saritx PC simultanja,

Ir-riżultati,

— piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla skedata; kif ukoll it-terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,

— il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal,

— ħin tat-tmiem tal-annimal u ħin tal-kejl ATP għal kull annimal,

— tabella tal-valuri RLU tal-ġurdien individwali u valuri SI għal kull grupp ta' trattament tad-doża,

— terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal RLU/ġurdien għal kull grupp tat-trattament u r-riżultati tal-analiżi ta' barra għal kull grupp ta' trattament,

▼M3

— l-SI kkalkulat u kejl xieraq tal-varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,

— analiżijiet statistiċi, fejn xieraq,

Diskussjoni tar-riżultati

— kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90–96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127–132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346–370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13–31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_-workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563–79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (38).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Negattiv falz: Sustanza identifikata ħażin bħala negattiva jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor: Kejl ta' kemm il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor hija determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm it-test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (38).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (38).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħrajn f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Assigurazzjoni tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li permezz tiegħu huma vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Affidabilità: Miżuri li bihom, metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, meta jwettqu l-istess protokoll. Din hija vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (38).

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku ta' induzzjoni, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jivvaluta l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dak fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

▼M3

B.51. **SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULU LIMFATIKU LOKALI BRDU-ELISA**

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. L-ewwel Metodu ta' Ttestjar (TM) (B.42) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali (Local Lymph Node Assay — LLNA; Linja gwida 429 tat-Test tal-OECD) ġie rivedut (1 u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness). Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u l-analiżi tax-xogħol assoċjat magħha ġew ippubblikati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Fl-LLNA, tintuża timidina jew jojdu radjoisotopiku biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti u għaldaqstant, l-analiżi għandha użu limitat fejn l-akkwiżizzjoni, l-użu jew l-eliminazzjoni tar-radjuattività huma problematiċi. L-LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Analiżi Immunosorbenti Relatata ma' Enzima)] huwa modifika mhux radjuattiva għat-TM tal-LLNA, li tuża 5-bromo-2-deossiuridina (BrdU) mhux radjutikkettata (Chemical Abstracts Service [CAS] Nru 59-14-3) f'sistema ta' test ibbażata fuq ELISA biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti. L-LLNA: BrdU-ELISA ġie vvalidat u rivedut u rakkomandat minn panil internazzjonali ta' analiżi minn pari xjentifika u indipendenti meqjus utli għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi sensitizzanti u mhux sensitizzanti, b'ċerti limitazzjonijiet (10) (11) (12). Dan it-TM huwa mfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD jużaw fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni tal-fniek tal-Indi u t-test Buehler (13). L-LLNA (Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 429 tat-Test OECD) u ż-żewġ modifikazzjonijiet mhux radjuattivi, LLNA: BrdU-ELISA (Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 B tat-Test OECD) u LLNA: DA (Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 A tat-Test OECD), kollha jipprovdu vantaġġ fuq it-testijiet tal-fniek tal-Indi f'B.6 u fil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD 13) f'termini ta' tnaqqis u rfinar tal-użu tal-annimali.

2. B'mod simili għal-LLNA, l-LLNA: BrdU-ELISA tistudja l-faži tal-induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva xierqa għall-valutazzjoni tar-reazzjoni tad-doża. Barra minn hekk, abilità li jinkixfu sensitizzaturi tal-ġilda mingħajr il-ħtieġa li tintuża radjutikketta għad-DNA telimina l-potenzjal għal esponiment fuq il-post tax-xogħol għal kwistjonijiet ta' radjuattività u ta' rimi ta' skart. Min-naħa tiegħu, dan jista' jippermetti għall-użu miżjud ta' ġrieden għall-kxif ta' sensitizzaturi tal-ġilda, li jnaqqas ulterjorment l-użu tal-fniek tal-Indi għal testijiet għal potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD) (13).

DEFINIZZJONIJIET

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA: BrdU-ELISA huwa metodu tal-LLNA modifikat għall-identifikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanzi kimiċi li huma sensitizzanti għall-ġilda, b'limitazzjonijiet speċifiċi. Din id-doża mhux neċessarjament timplika li f'kull każ, l-LLNA: BrdU-ELISA għandha tintuża minflok l-LLNA jew it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-test OECD) (13), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma (10) (11). Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u

▼M3

dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA: BrdU-ELISA hijiex adattata għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA: BrdU-ELISA [ara paragrafu 5]) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA: BrdU-ELISA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Madankollu, għandu l-potenzjal li jnaqqas l-użu tal-annimali għal dan il-għan meta mqabbel mat-testijiet bil-fniek tal-Indi (B.6; Linja gwida 406 tal-OECD) (13). Barra minn hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA joffri rfinar sostanzjali tal-mod kif jintużaw l-annimali għall-ittestjar ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku, minħabba li b'differenza minn B.6. u mil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD, l-LLNA: BrdU-ELISA ma jeħtieġx li r-reazzjonijiet ta' ipersensittività dermali indotti bi sfida jkunu enfasizzati. Barra minn hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA ma jeħtieġx l-użu ta' aġġuvant, bħal fil-każ tat-test tal-massimizzazzjoni tal-fenek tal-Indi (Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness,13). B'hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA inaqqas id-dieqa tal-annimal. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA: BrdU-ELISA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13), hemm xi limitazzjonijiet li jistgħu jeħtieġu l-użu ta' B.6 u l-Linja Gwida 13 tat-Test OECD (eż. l-ittestjar ta' ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal xi sustanzi tat-tip tensjoattivi] (6) (1, u l-Kapitolu B.42 f'dan l-Anness), solubilità tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (15) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13)). Limitazzjonijiet li ġew identifikati għal-LLNA (1, u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness) ġew rakkomandati sabiex japplikaw ukoll għal-LLNA: BrdU-ELISA (10). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA: BrdU-ELISA għandu jkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza kimika diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi kimiċi li jistgħu jinterferixxu mal-preċiżjoni tal-LLNA: BrdU-ELISA. Barra minn hekk, għandha tingħata konsiderazzjoni għall-possibilità ta' riżulatati pożittivi tal-limitu meta jinkisbu valuri ta' Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI) ta' bejn 1,6 u 1,9 (ara l-paragrafi 31-32). Dan huwa bbażat fuq il-bażi ta' dejta ta' validazzjoni ta' 43 sustanza li jużaw SI ≥ 1,6 (ara paragrafu 6) li għalihom, l-LLNA: BrdU-ELISA identifika b'mod korrett it-32 sensitizzatur tal-LLNA, iżda b'mod inkorrett identifika tnejn minn 11-il nonsensitizzatur tal-LLNA b'valuri tal-SI ta' bejn 1,6 u 1,9 (jiġifieri linja tal-limitu pożittiva) (10). Madankollu, minħabba li l-istess sett ta' dejta ntuża għall-issettjar tal-valuri SI u għall-kalkolu tal-karatteristiċi ta' tbassir tat-test, ir-riżultati ddikjarati jistgħu jkunu stima eċċessiva tal-karatteristiċi ta' tbassir reali.

PRINĊIPJI TA' DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA: BrdU-ELISA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjaħ l-SI, jiġi stabbilit, u għandu jkun ≥ 1,6 qabel ma tkun meħtieġa evalwazzjoni ulterjuri tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma

▼M3

bbażati fuq l-użu tal-kejl tal-kontenut tal-BrdU biex jindika għadd miżjud ta' ċelloli proliferanti fin-noduli tal-limfa awrikolari li jsaffu. BrdU huwa analogu ta' timidina u jiġi inkorporat b'mod simili fid-DNA ta' ċelloli li jipproliferaw. L-inkorporazzjoni tal-BrdU titkejjel b'ELISA, li tuża antikorp speċifiku għall-BrdU li huwa ttikkettat ukoll b'perossidaži. Meta jiżdied is-substrat, il-perossidaži jirreaġġixxi mas-substrat biex jipproduċi prodott ikkulurit li jiġi kwantifikat b'assorbenza speċifika permezz ta' qarrej tal-plakka f'livell ta' microtitre.

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi tal-għażla għal dan it-test. Studji ta' validazzjoni għal-BrdU-ELISA twettqu esklussivament bir-razza CBA/JN li għaldaqstant hija kkunsidrata r-razza ppreferuta (10) (12). Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħar, li huma nulliparuži u mhumiex tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 ġimgħat u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA: BrdU-ELISA.

Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (16), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 %, għajr waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel il-bidu tat-trattament, l-annimali kollha jiġu eżaminati sabiex ikun żgurat li huma ma jkollhom l-ebda feriti osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiži billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli bħala sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex dan juri l-kompetenza tal-laboratorju biex iwettaq b'suċċess kull

▼M3

analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Xi awtoritajiet regolatorji jeħtieġu wkoll PC għal kull studju u għaldaqstant, l-utenti huma mħeġġa jikkonsultaw mal-awtoritajiet rilevanti qabel iwettqu l-LLNA: BrdU-ELISA: Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu tali rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandu jipproduċi rispons pożittiv tal-LLNA: BrdU-ELISA f'livell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 1,6 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni hija riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 14 ikun jitqies eċċessiv). PC ippreferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Numru tal-CAS 101-86-0) u 25 % ewġenol (numru tal-CAS 97-53-0) fl-aċetun:żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Filwaqt li l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA: BrdU-ELISA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA: BrdU-ELISA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storika stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA: BrdU-ELISA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC mill-inqas f'10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena waħda).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA: BrdU-ELISA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom jiġu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati ta' studju negattivi ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodiku aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodiku mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubbjużi. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom jiġu kkunsidrati b'attenzjoni meta jkun deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (17).

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat fil-mezz li huwa magħruf li jqanqal reazzjoni konsistenti (eż. aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom l-ittestjar f'mezz mhux standard (formulazzjoni rilevanti klinikament/kimikament) ikun meħtieġ ukoll (18). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanja.

▼M3

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex isib il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

— xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,

— karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,

— dejta ta' appoġġ mil-LLNA: BrdU-ELISA,

— dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli tad-doża

17. Għal kull grupp ta' doża għandhom jintużaw tal-inqas erba' annimali, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u grupp ta' PC (simultanju jew reċenti, ibbażat fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dożi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Apparti fin-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom jiġu ġestiti u ttrattati b'mod identiku għall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi 2 u 19. Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (19)(20 u Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (6) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet, jista' jkun meħtieġ li jsir użu minn solvent kimikament rilevanti jew mill-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test hija kkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi idrofiliċi tat-test ikunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi għal kollox likwidi għandhom jiġu evitati.

▼M3

20. L-ipproċessar ta’ noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara paragrafu 33). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta’ ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tingħabar dejta dwar annimali individwali (17). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta’ dejta dwar annimali individwali. Ġbir regolari ta’ dejta dwar annimali individwali jipprovdi vantaġġ mil-lat tal-benesseri tal-annimal billi jevita ttestjar doppju li jkun meħtieġ li kieku r-riżultati tas-sustanza tat-test li tkun inġabret oriġinarjament b'xi mod (eż. permezz ta’ dejta miġbura dwar l-annimali) kellhom jiġu kkunsidrati aktar tard mill-awtoritajiet regolatorji ma’ rekwiżiti oħrajn (eż. dejta individwali dwar l-annimali).

Test ta’ qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta’ informazzjoni sabiex tkun stabbilita l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara paragrafu 18), għandu jsir test ta’ qabel l-iskrinjar sabiex jiġi definit il-livell ta’ doża xierqa li għandha tiġi ttestjata fl-LLNA: BrdU-ELISA. L-għan tat-test ta’ qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell tad-doża massima għall-użu fl-istudju tal-LLNA:BrdU-ELISA prinċipali, fejn informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li twassal għal tossiċità sistemika (ara paragrafu 24) u/jew għal irritazzjoni eċċessiva lokali tal-ġilda (ara paragrafu 23) mhijiex disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun konċentrazzjoni ta’ 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

22. It-test ta’ qabel l-iskrinjar isir taħt l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA: BrdU-ELISA, ħlief għall-fatt li ma hemmx valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta’ doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta’ doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta’ tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 6). Iż-żewġ widniet ta’ kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (20, u Kapitolu B.4 ta’ dan l-Anness). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta’ gejġ ta’ ħxuna (eż. mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) fl-ewwel Jum (qabel id-doża), fit-tielet Jum (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), u fis-sitt Jum. Barra minn hekk, fis-sitt Jum, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta’ determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta’ eritema ≥ 3 u/jew ħxuna tal-widna ta’ ≥ 25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (21) (22). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA: BrdU-ELISA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta’ konċentrazzjonijiet ta’ qabel l-iskrinjar (ara paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-Eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2

▼M3

Osservazzjoni	Punteġġ
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta' 25 % fil-ħxuna tal-widna (21) (22), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (30) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA: BrdU-ELISA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispneja, nifs maqtugħ, u ħsejjes mill-pulmun (rales), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' > 5 % fil-piż tal-ġisem minn Jum 1 sa Jum 6 u mortalità, għandhom jiġu kkunsidrati fl-evalwazzjoni. Annimali moribondi jew annimali li juru sinjali ta' uġigħ jew dieqa severa għandhom jinqatlu b'mod uman (31).

Skeda ta' sperimentazzjoni tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda sperimentali tal-analiżi hija kif ġej:

— *Jum 1:* Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15), fuq in-naħa ta' wara ta' kull widna.

— *Jiem 2 u 3:* Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni li għamilt f'Jum 1.

— *Jum 4:* L-ebda trattament.

— *Jum 5:* Injetta 0,5 mL (5 mg/ġurdien) ta' soluzzjoni BrdU (10 mg/mL) ġewwa l-peritonju.

— *Jum 6:* Ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Madwar 24 siegħa (24h) wara l-injezzjoni tal-BrdU, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' barra n-nodi limfatiċi awrikulari li jkunu qed inixxu minn kull widna tal-ġurdien u pproċessa separatament f'ilma bil-melħ ibbaferjat bil-fosfat (PBS) għal kull annimal. Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (17). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta' gejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

▼M3

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Minn kull ġurdien, titħejja sospensjoni ta' ċellola waħdanija ta' ċelloli tan-nodi limfatiċi (LNC — lymph node cells) maqtugħin bilateralment b'diżaggregazzjoni mekkanika ħafifa permezz ta' xibka tal-istainless steel b'malja ta' 200 micron jew permezz ta' teknika aċċettabbli oħra għall-ġenerazzjoni ta' sospensjoni ta' ċellola waħda (eż. użu ta' pestle tal-plastik li tintrema wara l-użu sabiex jitfarrku n-nodi limfatiċi segwit minn mogħdija minn malja tan-najlon ta' #70). Il-proċedura għat-tħejjija tas-sospensjoni LNC hija kritika f'din l-analiżi u għaldaqstant, kull operatur għandu jistabbilixxi l-ħila bil-quddiem. Barra minn hekk, in-nodi limfatiċi f'annimali NC huma żgħar, għalhekk operazzjoni attenta hija importanti sabiex ikun evitat kwalunkwe effett artifiċjali fuq il-valuri SI. F'kull każ, il-volum fil-mira tas-sospensjoni LNC għandu jiġi aġġustat sa volum ottimizzat determinat (bejn wieħed u ieħor 15 mL). Il-volum ottimizzat huwa bbażat fuq l-ilħiq ta' assorbenza medja tal-grupp NC fi ħdan 0,1–0,2.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni ċellolari (kejl tal-kontenut tal-BrdU fid-DNA ta' limfoċiti)

27. Il-BrdU titkejjel b'ELISA permezz ta' kit kummerċjali (*eż.* Roche Applied Science, Mannheim, Ġermanja, Numru tal-Katalgu 11 647 229 001). Fil-qosor, 100 µL tas-sospensjoni tal-LNC tiżdied mal-bjar ta' mikroplatt b'qiegħ ċatt fi triplikat. Wara fissazzjoni u denaturazzjoni tal-LNC, l-antikorp kontra l-BrdU jiżdied ma' kull bir u jitħalla jirreaġġixxi. Sussegwentement, l-antikorp kontra l-BrdU jitneħħa bil-ħasil u mbagħad, is-soluzzjoni tas-substrat tiżdied u titħalla tipproduċi kromoġen. Imbagħad titkejjel l-assorbenza ta' 370 nm b'wavelength ta' referenza ta' 492 nm. Fil-każijiet kollha, il-kundizzjonijiet tat-test tal-analiżi għandhom jiġu ottimizzati (ara paragrafu 26).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

28. Kull ġurdien għandu jiġi osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjani ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (31).

Piżijiet tal-ġisem

29. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

30. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI medja. L-SI jinkiseb billi wieħed jiddividi l-indiċi medju ta' ttikkettar tal-BrdU/ġurdien f'kull grupp tas-sustanza tat-test u l-grupp tal-PC, bl-indiċi medju ta' ttikkettar tal-BrdU għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed.

L-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU huwa definit bħala:

$$\text{Indiċi tat-tikkettar tal-BrdU} = (ABS_{em} - \text{ABS vojt}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS vojt}_{ref})$$

Fejn; em = wavelength tal-emissjoni; u ref = wavelength ta' referenza.

▼M3

31. Il-proċess tad-deċiżjoni jqis riżultat bħala pożittiv meta SI ≥ 1,6 (10). Madankollu, il-qawwa tar-relazzjoni tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali (jiġifieri valur SI bejn 1,6 u 1,9) jiġix iddikjarat pożittiv (3) (6) (32).

32. Għal rispons pożittiv marġinali bejn SI ta' 1,6 u 1,9, l-utenti jistgħu jkunu jridu jikkunsidraw informazzjoni addizzjonali bħar-relazzjoni doża-reazzjoni, evidenza ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni eċċessiva, u fejn xieraq, sinifikat statistiku flimkien ma' valuri SI sabiex jiġi kkonfermat li tali riżultati huma pożittivi (10). Għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensititizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tad-doża-reazzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall x'imkien ieħor f'dan id-dokument (4).

33. Il-ġbir ta' dejta fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti li ssir analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull valutazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari kontra tqabbil ta' kontroll ta' solvent simultanju/VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-valutazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ, ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi b'ċerti punti ta' dejta jew mingħajrhom (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

34. Id-dejta għandha tingħata fil-qosor f'għamla ta' tabella li turi l-valuri tal-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU tal-annimal individwali, l-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU medju tal-grupp/annimal, it-terminu ta' żball assoċjat tiegħu (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mas-solvent/grupp ta' kontroll tal-mezz simultanju.

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi kimiċi tat-test u ta' kontroll

— dejta tal-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott),

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, stabbiltà, solubilità),

— jekk taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti,

Solvent/mezz

— dejta tal-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat);

— raġuni għall-għażla tal-mezz,

▼M3

Annimali tat-test

— is-sors tal-ġrieden tas-CBA,

— l-istatus mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf,

— l-għadd u l-età tal-annimali,

— is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.,

Kondizzjonijiet tat-test

— is-sors, in-numru tal-lott u assigurazzjoni tal-kwalità tal-manifattur/dejta ta' kontroll tal-kwalità (sensittività tal-antikorp u speċifiċità u l-limitu ta' kxif) għall-kit tal-ELISA,

— dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,

— raġuni għall-għażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),

— il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikata,

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),

— dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni,

— metodi ta' kejl tat-tossiċità,

— kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi,

— dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju,

Verifika tal-affidabilità

— sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użati,

— PC simultanju u/jew storiku u dwar dejta ta' kontroll negattiv simultanju (solvent/mezz) għal-laboratorju li qed jagħmel it-test,

— jekk ma kienx hemm inkluż PC simultanju, id-dejta u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodiku reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta storika tal-PC għal-laboratorju li tiġġustifika l-bażi għaliex ma sarx PC simultanju,

Ir-riżultati

— piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla b'mod uman skedata; kif ukoll il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,

— il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal,

— tabella tal-valuri tal-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU u tal-valuri SI tal-ġurdien individwali għal kull grupp ta' trattament,

— terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal indiċi tat-tikkettar tal-BrdU/ġurdien għal kull grupp tat-trattament u r-riżultati tal-analiżi ta' barra għal kull grupp ta' trattament,

▼M3

— l-SI kkalkulat u kejl xieraq tal-varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,

— analiżijiet statistiċi, fejn xieraq,

Diskussjoni tar-riżultati

— kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Linja Gwida tat-Test Nru 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. u Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. u Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. u Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

(5) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employement of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponibbli fuq: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication Nru 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼**M3**

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. u Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Linja Gwida tat-Test Nru 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. u Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. u Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7 edizzjoni. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit:[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Linja Gwida tat-Test Nru 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. u DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. u Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. u Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. u Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. u Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. u Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(28) Vohr, H.W. u Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. u Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit:[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment Nru 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563–79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment Nru 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (33).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin: (i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala negattiv jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva (33).

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva (33).

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor: Kejl ta' kemm il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanza tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor hija determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm it-test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (33).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirrepplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (33).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħrajn f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li permezz tiegħu huma vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Affidabilità: Miżuri li bihom, metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, meta jwettqu l-istess protokoll. Din hija vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (33).

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku ta' induzzjoni, li jipprovoka reazzjoni immuni fil-ġilda li tista' twassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jivvaluta l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dak fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

▼M4

B.52. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA – METODU TA' KLASSI AKUTA TOSSIKA

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 436 (2009) tal-OECD. L-ewwel TG 403 dwar inalazzjoni akuta kienet adottata fl-1981, u minn dak iż-żmien 'l hawn kienet irriveduta (ara l-kapitolu B.2 ta' dan l-Anness (1)). Żvilupp ta' metodu ta' Klassi ta' Inalazzjoni Akuta Tossika (ATC) (2) (3) (4) tqies li kien xieraq wara l-adozzjoni tal-metodu ta' ATC orali rivedut (il-kapitolu B.1 tris ta' dan l-Anness) (5). Valutazzjoni retrospettiva tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar ta' ATC għal tossiċità ta' inalazzjoni akuta wera li l-metodu kien tajjeb biex jintuża għal finijiet ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar (6). Il-Metodu ta' Ttestjar ta' ATC ta' inalazzjoni jippermetti l-użu ta' stadji wieħed wara ieħor ta' konċentrazzjonijiet immirati fissi biex tkun ipprovduta gradazzjoni ta' tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. Il-letalità tintuża bħala punt ta' tmiem ewlieni, iżda annimali f'uġigħ sever jew f'diffikultà, fi tbatija jew f'mewta imminenti għandhom jinqatlu b'mod uman biex titnaqqas it-tbatija. Gwida dwar il-Punti tat-Tmiem b'Mod Uman huwa disponibbli fid-Dokument ta' Gwida Nru 19 tal-OECD (7).

2. Gwida dwar kif isir dan il-Metodu ta' Ttestjar jew l-interpretazzjoni tiegħu tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 39 dwar Ittestjar tat-Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta (GD 39) (8).

3. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma pprovduti fl-Appendiċi 1 u f'GD 39 (8).

4. Il-Metodu ta' Ttestjar jipprovdi informazzjoni dwar il-proprjetajiet perikoluži u jippermetti li l-kimika għall-ittestjar tiġi ggradata u kklassifikata skont ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, ta' kimiċi li jikkawżaw tossiċità akuta (9). F'każ li jkunu meħtieġa stimi ta' punti ta' valuri LC_{50} jew analiżi ta' konċentrazzjoni-rispons, il-kapitolu B.2 ta' dan l-Anness (1) huwa l-Metodu ta' Ttestjar adattat li għandu jintuża. Gwida ulterjuri dwar għażla ta' Metodu ta' Ttestjar tinsab f'GD 39 (8). Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux maħsub l-aktar għall-ittestjar ta' materjali speċjalizzati, bħal materjali iżometriċi jew fibruži li ftit jinħallu jew nanomaterjali manifatturati.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

5. Qabel ma jitqies l-ittestjar skont dan il-Metodu ta' Ttestjar, l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar, inklużi studji eżistenti li d-dejta tagħhom issostni li ma jsirx ittestjar addizzjonali, għandhom jitqiesu mil-laboratorju tal-ittestjar biex l-użu tal-annimali jkun mill-anqas. L-informazzjoni li tista' tassisti fl-għażla tal-ispeċi, razza, sess, mod ta' espożizzjoni u konċentrazzjonijiet ta' testijiet l-aktar adatti tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli u dejta tossikoloġika dwar kimiċi relatati strutturalment. Konċentrazzjonijiet li jkunu mistennija jikkawżaw uġigħ u diffikultà severi, minħabba azzjonijiet korruživi ([1]) jew irritanti b'mod sever, m'għandhomx ikunu ttestjati b'dan il-Metodu ta' Ttestjar [ara GD 39 (8)].

([1]) L-evalwazzjoni tal-korružività tista' tkun ibbażata fuq ġudizzju espert billi tintuża evidenza bħal: esperjenza tal-bnedmin u tal-annimali, dejta eżistenti (in vitro), eż. il-kapitolu B.40 (10), B.40 bis (11) ta' dan l-anness jew TG 435 tal-OECD (12), valuri ta' pH, informazzjoni minn kimiċi simili jew dejta pertinenti oħra.

▼M4

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Huwa l-prinċipju tat-test li abbaži ta' proċedura pass pass, tinkiseb informazzjoni suffiċjenti dwar it-tossiċità ta' inalazzjoni akuta tal-kimika għall-ittestjar matul perjodu ta' espożizzzjoni ta' 4 sigħat biex tkun tista' ssir klassifikazzjoni. Jistgħu japplikaw durati oħra ta' espożizzjoni biex jaqdu għanijiet regolatorji speċifiċi. F'kull wieħed mill-istadji definiti ta' konċentrazzjoni, ikunu ttestjati 3 annimali taż-żewġ sessi. Skont il-mortalità u/jew l-istat moribond tal-annimali, 2 stadji jistgħu jkunu suffiċjenti biex jitħalla jsir ġudizzju dwar it-tossiċità akuta tal-kimika għall-ittestjar. Jekk tkun ipprovduta evidenza li sess wieħed ikun aktar suxxettibbli mill-ieħor, fil-każ it-test jista' jitkompla mas-sess l-aktar suxxettibbli biss. Ir-riżultat tal-istadju ta' qabel għandu jiddetermina l-istadju li jkun imiss b'dan li:

(a) Ma jkunx meħtieġ ittestjar aktar,

(b) Ittestjar ta' tliet annimali għal kull sess, jew

(c) Ittestjar b'6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli biss, jiġifieri l-istimi tal-limiti aktar baxxi tal-klassi tossika għandhom ikunu bbażati fuq 6 annimali għal kull grupp ta' test ta' konċentrazzjoni, irrispettivament mis-sess.

7. L-annimali moribondi jew annimali li jkunu jidhru li jkunu muġugħa jew li juru sinjali ta' diffikultà severa u li ttul għandhom jinqatlu b'mod uman, u jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bl-istess mod bħall-annimali li jkunu mietu fit-test. Kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni li jinqatlu annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu ħafna, u gwida biex ikun magħruf meta l-mewt tkun tista' titbassar jew tkun waslet qrib ħafna, huma s-suġġett tad-Dokument ta' Gwida Nru 19 dwar Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (7).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimali

8. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi ppreferuta hija l-far u għandhom ikunu pprovduti ġustifikazzjonijiet jekk jintużaw speċijiet oħra.

Preparazzjoni tal-annimali

9. Nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal. Fil-jum ta' espożizzjoni, annimali għandhom ikunu adulti żgħażagħ ta' 8 sa 12-il ġimgħa fl-età, u l-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' ±20 % tal-piż medju għal kull sess ta' kull annimal espost qabel tal-istess età. L-annimali jintgħażlu b'mod każwali, jiġu mmarkati għal identifikazzjoni individwali. L-annimali jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 ijiem qabel ma jibda t-test biex jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. L-annimali għandhom ukoll ikunu akklimatizzati għall-apparat tat-test għal perjodu qasir qabel l-ittestjar, minħabba li dan inaqqas it-tensjoni kkawżata bl-introduzzjoni għall-ambjent il-ġdid.

Trobbija tal-annimali

10. It-temperatura tal-kamra taż-żamma tal-annimali tal-esperimeti għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-għadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull annimal u għandu jimminimizza t-telf minħabba kannibaliżmu u ġlied. Meta annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieħer biss, jista' jkun jeħtiġilhom jidraw it-tubi ta' trażżin. It-tubi ta' trażżin m'għandhomx jimponu tensjoni

▼M4

fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusklu. Jekk dejta ġenerika tkun disponibbli li turi li ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa ċertu limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx meħtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trażżin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jitħallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' sħabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, ħlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

Kmamar tal-inalazzjoni

11. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-għan tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-mod preferut ta' espożizzjoni huwa mill-imnieħer biss (liema fraži tinkludi r-ras biss, l-imnieħer biss jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieħer biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu aħjar billi tintuża modalità ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu, iżda dan għandu jkun iġġustifikat fir-rapport tal-istudju. Biex tkun żgurata stabbiltà tal-atmosfera meta tintuża kamra għall-ġisem kollu, il-volum totali tal-annimali tat-test m'għandux ikun aktar minn 5 % tal-volum tal-kamra. Prinċipji ta' tekniki ta' espożizzjoni mill-imnieħer biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma deskritti f'GD 39 (8).

KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Amministrazzjonijiet ta' konċentrazzjonijiet

12. Huwa rrakkomandat li espożizzjoni ddum erba' sigħat fissi, eskluż ħin ta' ekwilibrazzjoni. Jistgħu jkunu meħtieġa espożizzjonijiet li jdumu aktar biex jitħarsu rekwiżiti speċifiċi, iżda, għandha tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta' studju [ara GD 39 (8)]. L-annimali esposti fi kmamar għall-ġisem kollu għandhom jingħalqu individwalment biex ma jitħallewx jibilgħu kimika għall-ittestjar minħabba tindif ta' sħabhom fil-gaġġa. M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzzjoni. Jista' jingħata ilma matul espożizzjoni kollha mill-ġisem kollu.

13. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew taħlita tagħhom. L-istat fiżiku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fiżika li x'aktarx tkun preżenti matul l-immaniġġar u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet esplussivi.

Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli

14. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex jitħalla jkun hemm espożizzjoni tar-reġjuni kollha rilevanti tas-sistema respiratorja, huma rrakkomandati aerosols b'dijametri ajrudinamiċi ta' medja massa (MMAD) f'firxa minn 1 sa 4 μm b'devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g) fil-firxa ta' 1,5 sa 3,0 (8) (13) (14). Għalkemm għandu jsir sforz raġonevoli biex dan l-istandard jintlaħaq, għandu jingħata ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, dħaħen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u partiċelli, fibri u materjali igroskopiċi mimlijin (li jikbru fid-daqs fl-ambjent niedi tas-sistema respiratorja) jistgħu jaqbżu dan l-istandard.

▼M4

Preparazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'vejjikolu

15. Jista' jintuża vejjikolu biex jiġġenera konċentrazzjoni u daqs ta' partiċelli xierqa tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera. Bħala regola, l-ilma għandu jingħata preferenza. Materjal ta' partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex tinkiseb id-distribuzzjoni ta' daqs meħtieġ ta' partiċelli, iżda għandha tingħata attenzjoni li ma titħassarx jew tinbidel il-kimika għall-ittestjar. F'każijiet fejn proċessi mekkaniċi jitqiesu li jkunu bidlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar (eż. temperatura estrema minn tħin eċċessiv minħabba frizzjoni), il-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun ivverifikata b'mod analitiku. Għandha tingħata attenzjoni adegwata biex il-kimika għall-ittestjar ma tkunx ikkontaminata. Ma jkunx meħtieġ li jkunu ttestjati materjali mrammla mhux nutrittivi li jkunu fformulati apposta biex ma jkunux jistgħu jittieħdu man-nifs. Għandu jintuża test ta' attrizzjoni biex jintwera li partiċelli li jistgħu jittieħdu man-nifs ma jkunux prodotti meta jkun itrattat materjal granulari. Jekk test ta' attrizzjoni jipproduċi partiċelli li jkunu jistgħu jittieħdu man-nifs, għandu jsir test għat-tossiċità li tittieħed man-nifs.

Annimali tal-kontroll

16. Ma jkunx meħtieġ grupp ta' kontroll konkurrenti negattiv (arja). Meta vejjikolu, minbarra ilma, jintuża biex jassisti biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test, grupp ta' kontroll ta' vejjikoli għandu jintuża biss meta dejta storika ta' teħid ta' tossiċità man-nifs ma tkunx disponibbli. Jekk studju dwar tossiċità ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma juri ebda tossiċità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata; għalhekk ma jkunx meħtieġ kontroll ta' vejjikolu.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Fluss tal-arja fil-kamra

17. Il-fluss ta' arja mal-kamra għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u rreġistrat mill-anqas kull sieħa matul kull espożizzjoni. Il-monitoraġġ ta' konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdi mezzi indiretti għall-kontroll tal-parametri dinamiċi rilevanti kollha ta' ġenerazzjoni ta' atmosfera. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex tkun evitata inalazzjoni mill-ġdid fi kmamar għall-imnieħer biss f'każijiet fejn fluss tal-arja mis-sistema ta' espożizzjoni ma jkunx adegwat biex jipprovdi fluss dinamiku ta' atmosfera tal-kimika għall-ittestjar. Hemm metodoloġiji preskritti li jistgħu jintużaw biex jintwera li inalazzjoni mill-ġdid ma ssirx skont il-kundizzjonijiet operattivi magħżula (8) (15). Konċentrazzjoni ta' ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u konċentrazzjoni ta' dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wieħed jemmen li dawn l-istandards ma jkunux jistgħu jintlaħqu, konċentrazzjonijiet ta' ossiġenu u ta' dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu.

Temperatura tal-kamra u umdità relattiva

18. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm għall-22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieħer biss, kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata u rreġistrata mill-anqas tliet darbiet għal perjodi ta' sa 4 siegħat, u kull sieħa għal perjodi aqsar. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati taħlitiet ibbażati fl-ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minħabba interferenza minn kimika għall-ittestjar mal-metodu tal-ittestjar.

▼M4

Kimika għall-ittestjar: konċentrazzjoni nominali

19. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominal tal-kamra ta' espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda tintuża bħala paragun tal-konċentrazzjoni nominali, u l-konċentrazzjoni attwali tagħti indikazzjoni tal-effiċjenza ta' ġenerazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, tista' tintuża biex jinkixfu problemi ta' ġenerazzjoni.

Kimika għall-ittestjar: konċentrazzjoni attwali

20. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fiżżona fejn l-annimali jieħdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu jew b'metodi speċifiċi (eż. teħid dirett ta' kampjuni, metodi ta' assorbiment jew kimiċi reattivi u karatterizzazzjoni analitika sussegwenti) jew b'metodi mhux speċifiċi bħal analiżi gravimetrika b'filtru. L-użu ta' analiżi gravimetrika huwa aċċettabbli biss għal aerosols tat-trab b'komponent wieħed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilità baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għall-kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'ħafna komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analiżi gravimetrika. Iżda din teħtieġ dejta analitika li turi li l-kompożizzjoni ta' materjal tal-ajru tkun simili għall-materjal tal-bidu. Jekk din l-informazzjoni ma tkunx disponibbli, tista' tkun meħtieġa analiżi mill-ġdid tal-kimika għall-ittestjar (idealment fl-istat tagħha fl-arja) f'intervalli regolari waqt li jkun għaddej l-istudju. Għal aġenti aerosolizzati li jistgħu jevaporaw jew jissubblimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu nġabru bil-metodu magħżul. Il-konċentrazzjonijiet immirati, nominali u attwali għandhom ikunu pprovduti fir-rapport tal-istudju, iżda konċentrazzjonijiet attwali biss jintużaw fl-analiżi ta' statistika biex ikunu kkalkulati valuri ta' konċentrazzjonijiet letali.

21. Għandu jintuża lott wieħed tal-kimika għall-ittestjar, jekk ikun possibbli, u l-kampjun tat-test għandu jinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-purezza, l-omoġeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbeda l-istudju, għandu jkun hemm karatterizzazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkluża l-purezza tagħha, u jekk teknikament fattibbli, l-identità u l-kwantitajiet ta' kontaminanti u impuritajiet identifikati. Dan jista' jintwera bid-dejta li ġejja, iżda ma jkunx limitat għaliha: ħin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimi oħra. Għalkemm l-identità tal-kampjun tat-test mhix ir-responsabbiltà tal-laboratorju tat-test, ikun prudenti għal-laboratorju tat-test li jikkonferma l-karatterizzazzjoni tal-isponser mill-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

22. L-atmosfera ta' espożizzjoni għandha tinżamm kemm prattikabbilment kostanti u tkun immonitorjata kontinwament u/jew kull tant skont il-metodu ta' analiżi. Meta jintuża t-teħid ta' kampjuni kull tant, għandhom jittieħdu kampjuni tal-atmosfera tal-kamra mill-anqas darbtejn għal studju ta' erba' sigħat. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minħabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew konċentrazzjonijiet baxxi, ikun jista' jinġabar kampjun wieħed tul il-perjodu kollu ta' espożizzjoni. Jekk iseħħ ċaqliq minn kampjun għal kampjun, il-konċentrazzjonijiet ittestjati li jkun imiss għandhom jużaw erba' kampjuni għal kull espożizzjoni. Kampjuni individwali tal-konċentrazzjoni tal-kamra m'għandhomx jiddevjaw mill-konċentrazzjoni medja tal-kamra b'aktar minn ± 10 % għal gassijiet u fwar, u b'mhux aktar minn ± 20 % għal aerosols likwidi jew solidi. L-ekwilibrazzjoni ta' ħin ma' kamra (t_{95}) għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-ħin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata u din tqis il-ħinijiet meħtieġa biex jinkiseb t_{95}. Gwida għal stima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (8).

▼M4

23. Għal kull taħlita kumplessa ħafna magħmula minn fwar/gassijiet u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodotti/mezzi ta' użu finali b'għan speċifiku), kull fażi tista' taġixxi b'mod differenti f'kamra tal-inalazzjoni, għalhekk għandha tintgħażel mill-anqas sustanza (analita) waħda bħala indikatur, normalment is-sustanza attiva prinċipali fit-taħlita, ta' kull fażi (fwar/gass u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun taħlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata għat-taħlita totali u mhux biss għall-ingredjent attiv jew għall-komponent (analita). Informazzjoni addizzjonali dwar konċentrazzjonijiet attwali tinsab f'GD 39 (8).

Kimika għall-ittestjar: distribuzzjoni tad-daqs ta' partiċelli

24. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas darbtejn matul kull espożizzjoni ta' 4 sigħat billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv bħall-għodda ajrudinamika li tagħti d-daqs tal-partiċelli. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza tar-riżultati miksubin minn impattur kaskata jew strument alternattiv, f'dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista' jintuża tul l-istudju kollu. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża flimkien mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-ġbir. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi tad-daqs ta' partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi b'filtru [ara GD 39 (8)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-fażi bikrija tal-istudju, f'dak il-każ kejlijiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jitħallew barra. Għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri li jimminimizzaw dejta inkonklussiva li tista' twassal għal ħtieġa ta' ripetizzjoni ta' espożizzjoni. Teħid tad-daqs ta' partiċelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista' tirriżulta kondensazzjoni ta' fwar fil-formazzjoni ta' aerosol, jew jekk jinstabu partiċelli f'atmosfera ta' fwar b'potenzjal għal fażijiet imħallta (ara l-paragrafu 14).

PROĊEDURA

Test ewlieni

25. Għal kull stadju jintużaw tliet annimali għal kull sess, jew sitt annimali tas-sess aktar suxxettibbli. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Il-livell ta' konċentrazzjoni li għandu jintuża bħala d-doża tal-bidu jintgħażel minn wieħed minn erba' livelli fissi u l-livell ta' konċentrazzjoni tal-bidu għandu jkun dak li l-aktar probabbli jipproduċi tossiċità f'xi annimali dożati. L-iskemi ta' ttestjar għal gassijiet, fwar u aerosols (inklużi fl-Appendiċijiet 2-4) jirrappreżentaw l-ittestjar b'valuri ta' limitu tal-kategoriji ta' CLP 1-4 (9) għal gassijiet (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (Appendiċi 2), għal fwar (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (Appendiċi 3) u għal aerosols (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (Appendiċi 4). Il-Kategorija 5, li mhix implimentata fir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) hija relatata ma' konċentrazzjonijiet 'il fuq mill-konċentrazzjonijiet rispettivi ta' limitu. Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu tapplika l-iskema ta' ttestjar rispettiva. Skont l-għadd ta' annimali maqtula b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati sakemm tkun tista' ssir kategorizzazzjoni.

26. L-intervall ta' żmien bejn gruppi ta' espożizzjoni jkun iddeterminat malli jfaqqgħu sinjali tossiċi, kemm idumu u s-severità tagħhom. Espożizzjoni ta' annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha tittawwal sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli fis-sopravivenza tal-annimali li jkunu ġew ittestjati qabel. Perjodu ta' tlieta jew erbat ijiem bejn l-espożizzjonijiet f'kull livell ta' konċentrazzjoni huwa rrakkomandat biex titħalla ssir l-osservazzjoni ta' tossiċità mdewma. L-intervall ta' żmien jista' jkun aġġustati skont il-każ, eż. f'każ ta' risponsi inkonklusivi.

▼M4

Test ta’ limitu

27. It-test ta’ limitu jintuża meta l-kimika għall-ittestjar tkun magħrufa jew mistennija li tkun kważi mhux tossika, jiġifieri li tislet rispons tossiku ‘l fuq biss mill-konċentrazzjoni regolatorja ta’ limitu. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar tista’ tinkiseb minn tagħrif dwar sustanzi ttestjati simili jew minn taħlitiet simili, billi titqies l-identità u l-perċentwali ta’ komponenti magħrufin li jkunu ta’ sinifikat tossikoloġiku. F’dawk is-sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ftit jew ebda informazzjoni dwar it-tossiċità tagħha, jew fejn il-kimika għall-ittestjar tkun mistennija li tkun tossika, għandu jsir it-test ewlieni [gwida ulterjuri tinsab f’GD 39 (8)].

28. Bl-użu tal-proċedura normali, tliet annimali għal kull sess, jew sitt annimali tas-sess aktar suxxettibbli, ikunu esposti f’konċentrazzjonijiet ta’ 20 000 ppm għal gassijiet, 20 mg/l għal fwar u 5 mg/l għal trabijiet/raxxijiet, rispettivament (jekk ikunu jistgħu jinkisbu), li jservu bħala t-test ta’ limitu għal dan il-Metodu ta’ Ttestjar. Meta jkunu ttestjati aerosols, l-għan primarju għandu jkun li jinkiseb daqs ta’ partiċelli li jkun jista’ jittieħed man-nifs (jiġifieri MMAD ta’ 1-4 μm). Dan ikun possibbli għal kważi l-kimiċi kollha għall-ittestjar f’konċentrazzjoni ta’ 2 mg/l. Ittestjar ta’ aerosols f’aktar minn 2 mg/l għandu jkun ittentat biss jekk ikun jista’ jinkiseb daqs ta’ partiċelli li jkun jista’ jittieħed man-nifs [ara GD 39 (8)]. Skont GHS (16), ittestjar li jkun jeċċedi konċentrazzjoni limitata huwa skuraġġit għal raġunijiet ta’ trattament xieraq tal-annimali. Ittestjar fil-Kategorija 5 GHS (16), li mhux implimentat fir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9), għandu jitqies biss meta jkun hemm probabbiltà kbira li riżultati ta’ test bħal dan ikun se jkollhom rilevanza diretta għall-protezzjoni tas-saħħa tal-bniedem, u tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta’ studju. Fil-każ ta’ kimiċi għall-ittestjar potenzjalment esplożivi, għandha tingħata attenzjoni biex ikunu evitati kundizzjonijiet favorevoli għal splużjoni. Biex ikun evitat l-użu mhux meħtieġ tal-annimali, għandu jsir test ta’ prova mingħajr l-annimali qabel it-test ta’ limitu sabiex ikun żgurat li l-kundizzjonijiet tal-kamra għat-test ta’ limitu jkunu jistgħu jinkisbu.

OSSERVAZZJONIJIET

29. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament sikwit matul il-perjodu ta’ espożizzzjoni. Wara espożizzjoni, osservazzjonijiet kliniċi għandhom isiru mill-anqas darbtejn fil-jum ta’ espożizzjoni jew aktar sikwit meta indikat mir-rispons tal-annimali għal trattament, u mill-anqas darba kuljum minn hemm ‘il quddiem għal total ta’ 14-il jum. It-tul tal-perjodu ta’ osservazzjoni ma jkunx iffissat, iżda għandu jkun iddeterminat min-natura u miżżmien meta jfaqqgħu sinjali kliniċi u mit-tul tal-perjodu ta’ rkupru. Id-drabi li fihom sinjali ta’ tossiċità jidhru u jgħibu huma importanti, l-aktar jekk ikun hemm tendenza li sinjali ta’ tossiċità jdumu ma jidhru. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati sistematikament b’reġistri individwalment miżmumin għal kull annimal. L-annimali li jinstabu li jkunu f’kondizzjoni moribonda u annimali li juru uġigħ sever u/jew sinjali li jdumu ta’ diffikultà għandhom jinqatlu b’mod uman għal raġunijiet ta’ trattament xieraq tal-annimali. Għandha tingħata attenzjoni meta jsiru eżamijiet għal sinjali kliniċi ta’ tossiċità biex meta jidhru ftit għall-bidu u jkun hemm bidliet respiratorji li jgħaddu malajr, li jiġu minn proċedura ta’ espożizzjoni, wieħed ma jiħux żball u jaħsibhom effetti relatati ma’ trattament. Għandhom jitqiesu l-prinċipji u l-kriterji miġburin fil-qosor fid-Dokument ta’ Gwida dwar il-Punti tat-Tmiem b’Mod Uman (7). Meta annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b’mod preċiż kemm jista’ jkun.

▼M4

30. Osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn u l-membrani mukuži, u wkoll fis-sistema respiratorja, ċirkulatorja, awtonomika u nervuża ċentrali, u f'attività somatomotorja u xejriet ta' mġiba. Meta jkun possibbli, kull differenzjar bejn effetti lokali u sistemiċi għandu jkun innotat. Attenzjoni għandha tkun diretta għal osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulżjonijiet, tibżiq, dijarea, letarġija, rqad u koma. Il-kejl ta' temparaturi tar-rektum jista' jipprovdi evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ta' ipo/ipertermja relatati ma' trattament jew għeluq.

Piżijiet tal-ġisem

31. Il-piżijiet individwali ta' kull annimal għandhom jiġu rreġistrat darba matul l-perjodu ta' akklimatazzjoni, fil-jum ta' espożizzjoni qabel espożizzjoni (jum 0) u mill-anqas fil-jiem 1, 3 u 7 (u kull ġimgħa minn hemm 'il quddiem), u fil-ħin tal-mewt jew ewtanasja jekk jinqabeż jum 1. Il-piż tal-ġisem huwa rikonoxxut bħala indikatur kritiku ta' tossiċità, u annimali li juru tnaqqis sostnut ta' > 20 %, mqabbel ma' valuri ta' qabel l-istudju, għandhom ikunu mmonitorjati mill-qrib. L-annimali li jibqgħu ħajjin jintiżnu u jinqatlu b'mod uman fi tmiem il-perjodu ta' wara l-espożizzjoni.

Patoloġija

32. L-annimali kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jinqatlu bl-ewtanasja u jitneħħew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal awtopsja makroskopika. Jekk ma tkunx tista' ssir awtopsja minnufih wara li jkun instab annimal mejjet, l-annimal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperaturi baxxi biżżejjed biex tkun imminimizzata awtoliżi. Awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopiċi kollha għandhom jiġi rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.

33. Eżamijiet addizzjonali inklużi *a priori* dawk imfasslin apposta jistgħu jitqiesu li jestendu l-valur interpretattiv tal-istudju, bħall-kejl tal-piż tal-pulmun ta' firien li jkunu baqgħu ħajjin u/jew li jipprovdu evidenza ta' irritazzjoni b'eżami mikroskopiku tas-sistema respiratorja. Organi eżaminati jistgħu jinkludu dawk li juru evidenza ta' patoloġija makroskopika f'annimali li jibqgħu jgħixu għal 24 siegħa jew aktar, u organi magħrufin jew mistennija li jkunu affettwati. L-eżami mikroskopiku tas-sistema respiratorja kollha jista' jipprovdi informazzjoni utli dwar kimiċi għall-ittestjar li huma reattivi mal-ilma, bħal aċidi u kimiċi igroskopiċi għall-ittestjar.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

34. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwali fir-rigward tal-piżijiet tal-ġisem u s-sejbiet mill-awtopsji. Dejta dwar osservazzjonijiet kliniċi għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali użati, l-għadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali speċifiċi ta' tossiċità, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-ħin tal-mewt ta' kull annimal, deskrizzjoni u kemm jieħdu żmien effetti tossiċi u riversibbiltà, u sejbiet minn awtopsji.

▼M4

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skont il-każ:

Annimali tat-test u trobbija

— Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta;

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far;

— Għadd, età u sess tal-annimali;

— Metodu ta' każwalità;

— Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma);

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test, inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard;

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza, u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża isomerizzazzjoni).

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS), jekk ikunu magħrufa;

Vejjikolu

— Ġustifikazzjoni għal użu ta' vejjikolu u ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

— Dejta storika jew konkurrenti li turi li l-vejjikolu ma jfixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni tal-kamra tal-inalazzjoni inklużi d-dimensjonijiet u l-volum;

— Sors u deskrizzjoni tat-tagħmir użat għall-espożizzjoni tal-annimali kif ukoll għall-ġenerazzjoni tal-atmosfera;

— Tagħmir għall-kejl tat-temperatura, umdità, daqs tal-partiċelli u konċentrazzjoni attwali;

— Sors ta' arja, trattament ta' arja pprovduta/estratta u sistema użata għal kondizzjonament;

— Metodi użati għall-kalibrazzjoni tat-tagħmir biex tkun żgurata atmosfera omoġenea tat-test;

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva);

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieħer biss); tqegħid tal-annimali fis-sistema (ġisem kollu);

— Omoġenità/stabbiltà temporali tal-atmosfera tat-test;

— Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u teħid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;

— Rati tal-fluss tal-arja, rata tal-fluss tal-arja/port ta' espożizzjoni (imnieħer biss), jew toqol tal-annimali/kamra (il-ġisem kollu);

— Informazzjoni dwar it-tagħmir użat għall-kejl tal-ossiġenu u tad-dijossidu tal-karbonju, jekk applikabbli;

▼M4

— Ħin meħtieġ biex jintlaħaq ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t_{95});

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli);

Dejta ta' espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni;

— Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal ġol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra);

— Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-żona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal taħlitiet tat-test li jipproduċu forom fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament;

— Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (eż. mg/l, mg/m^3, eċċ.); unitajiet ta' volum (eż. ppm, ppb) jistgħu wkoll ikunu rrappurtati f'parenteżi;

— Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli, dijametru ajrudinamiku ta' medjan tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Għandha tkun irrappurtata analiżi waħda għal kull daqs ta' partiċelli.

Kundizzjonijiet tat-test

— Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kull proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs ta' partiċelli ta' sustanzi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar. F'każijiet fejn il-proċessi mekkaniċi jkunu setgħu biddlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkludi r-riżultati tal-analiżi li tivverifika l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— Deskrizzjoni (preferibbilment inkluża dijagramma) tat-tagħmir użat biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test u biex l-annimali jkunu esposti għall-atmosfera tat-test;

— Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u l-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-teħid tal-kampjuni);

— Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet tat-test;

Riżultati

— Tabulazzjoni tat-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss tal-arja;

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' konċentrazzjoni nominali u attwali tal-kamra;

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar id-daqs ta' partiċelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs ta' partiċelli u kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g;

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar rispons u ta' livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, u durata tal-effetti);

— Piżijiet individwali ta' kull ġisem ta' annimali miġburin f'jiem ta' studju, data u ħin tal-mewt jekk qabel l-ewtanasja skedata; kemm ikun għadda żmien meta jfaqqgħu sinjali ta' tossiċità, u jekk dawn kinitx riversibbli għal kull annimal;

▼M4

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli;

— Il-klassifikazzjoni tal-kategorija CLP u l-valur ta' limitu LC_{50};

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfażi partikolari għad-deskrizzjoni ta' metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-konċentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-partiċelli;

— Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni tal-partiċelli fid-dawl tas-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-partiċelli ma setgħux jitħarsu;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni tal-konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probbbali tal-mewt u l-modalità predominanti ta' azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati;

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm ħtieġa li b'mod uman jinqatlu annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (7).

LETTERATURA:

(1) Il-Kapitolu B.2 ta' dan l-Anness, Tossiċità Akuta (Inalazzjoni).

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Il-Kapitolu B.1 tris ta' dan l-Anness, Tossiċità Orali Akuta — Metodu tal-Klassi Akuta Tossika.

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

(10) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness: Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test ta' Reżistenza Elettrika Transkutanea (TER).

(11) Il-Kapitolu B.40 bis ta' dan l-Anness: Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test Mudell tal-Ġilda Umana.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 2

Proċedura li għandha tkun segwita minn kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-gassijiet (ppm/4h)

Rimarki ġenerali ([1])

Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu, l-iskemi rispettivi ta' ttestjar kif inklużi f'din l-Appendiċi jagħtu profil tal-proċedura li għandha tkun segwita.

Appendiċi 2a: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 100 ppm

Appendiċi 2b: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 500 ppm

Appendiċi 2c: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 2 500 ppm

Appendiċi 2d: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 20 000 ppm

Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

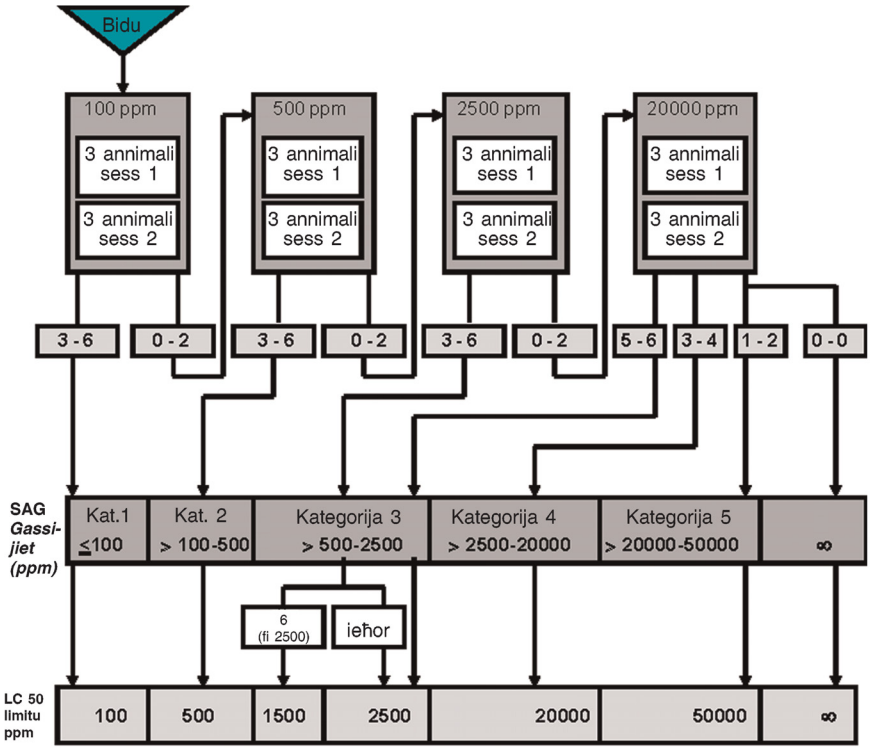
([1]) Fit-tabelli li ġejjin qed issir referenza għall-GHS (Sistema Globali Armonizata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossiċità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼**M4**

Appendiċi 2a

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 100 ppm/4h għall-gassijiet



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

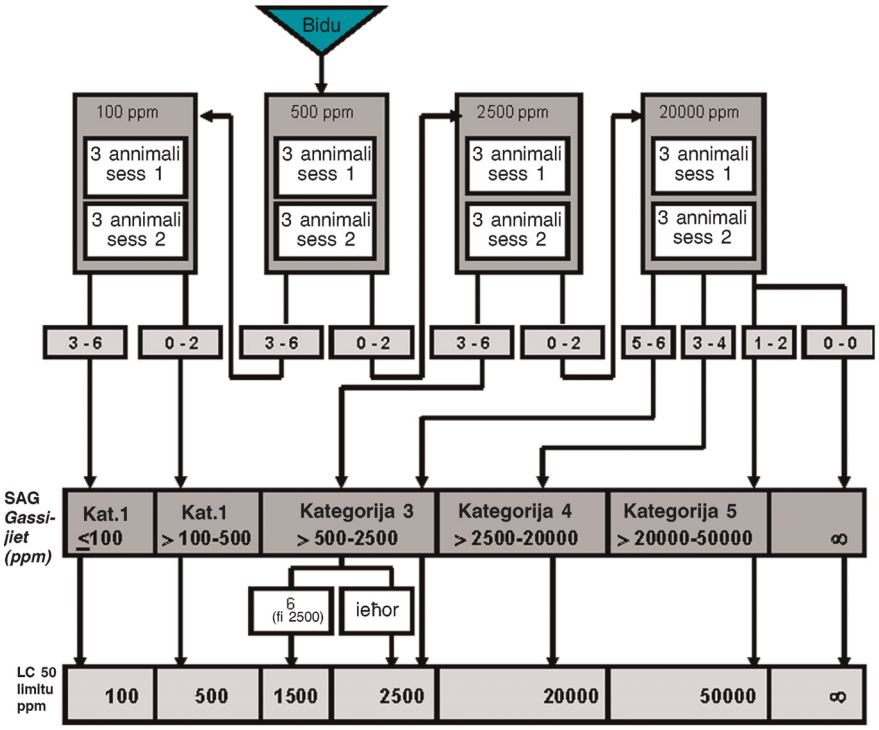
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 2b

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 500 ppm/4h għall-gassijiet



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

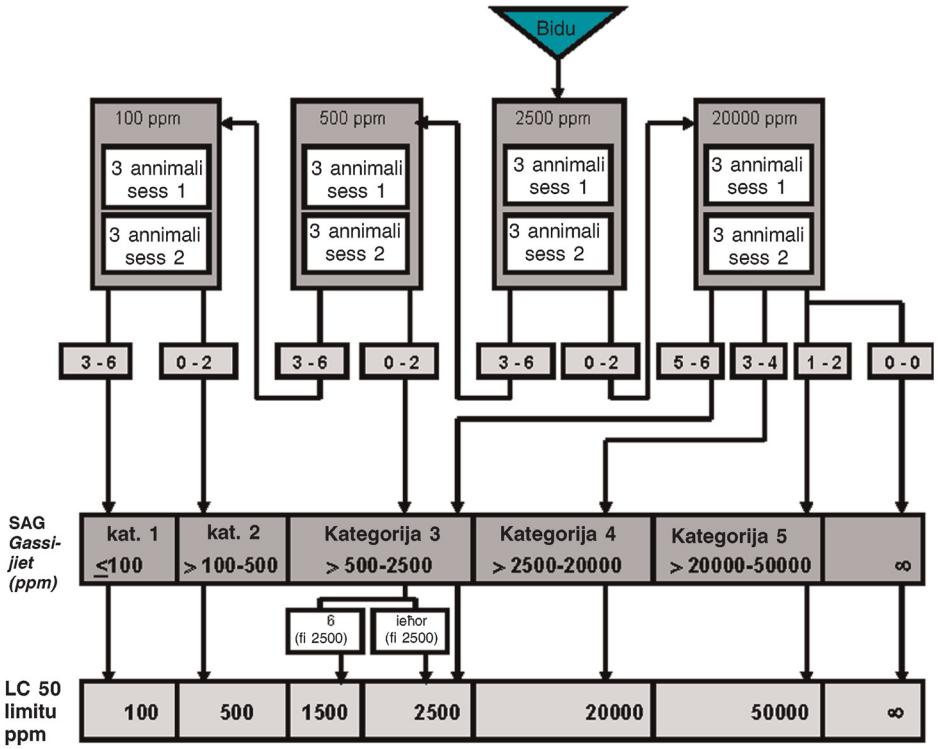
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 2c

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 2 500 ppm/4h għall-gassijiet



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0–6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

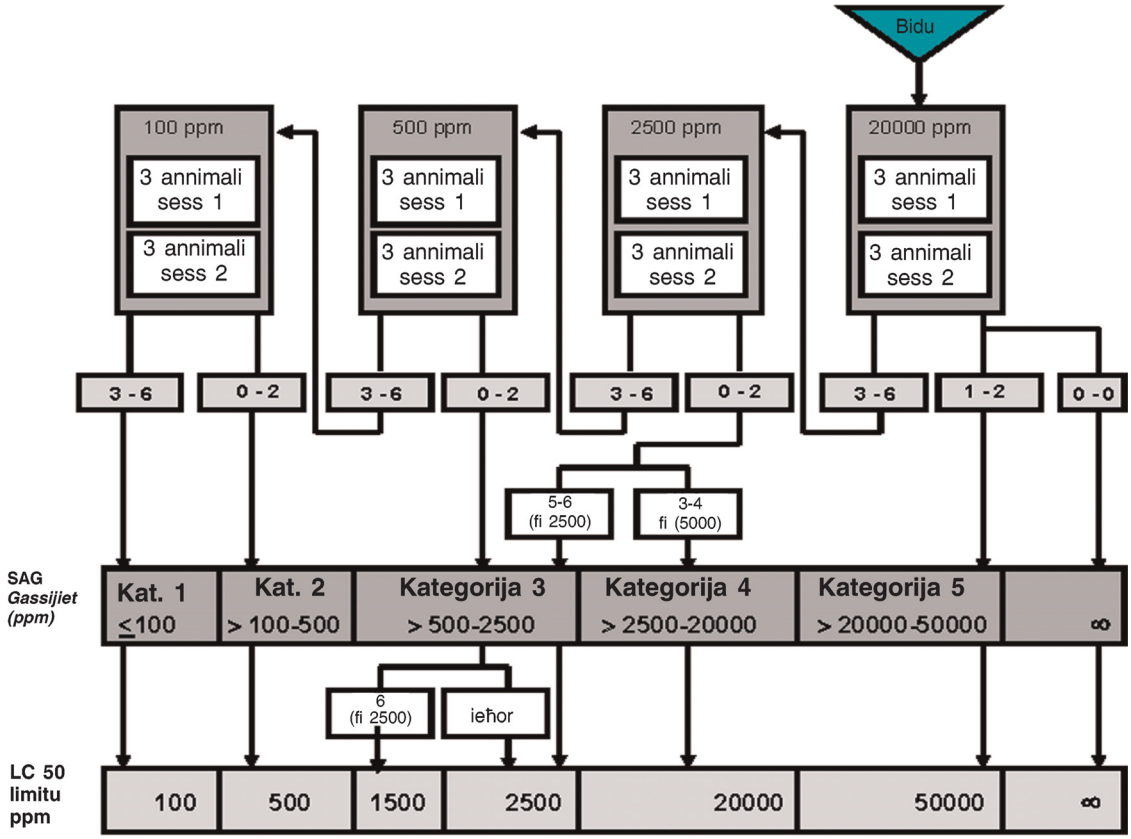
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 2d

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 20 000 ppm/4h għall-gassijiet



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼**M4**

Appendiċi 3

Proċedura li għandha tkun segwita minn kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-fwar (mg/l/4h)

Rimarki ġenerali ([1])

Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu, l-iskemi rispettivi ta' ttestjar kif inklużi f'dan l-Appendiċi jagħtu profil tal-proċedura li għandha tkun segwita.

Appendiċi 3a: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,5 mg/l

Appendiċi 3b: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 2,0 mg/l

Appendiċi 3c: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 10 mg/l

Appendiċi 3d: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 20 mg/l

Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

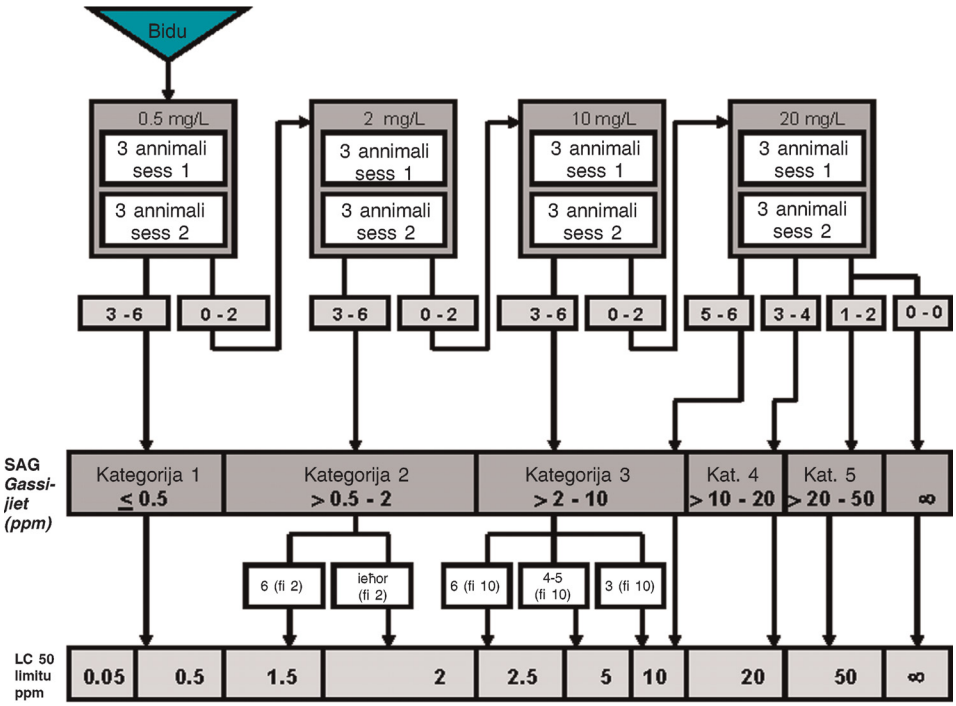
([1]) Fit-tabelli li ġejjin qed issir referenza għall-GHS (Sistema Globali Armonizata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossiċità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼M4

Appendiċi 3a

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 0,5 mg/L/4h għall-fwar



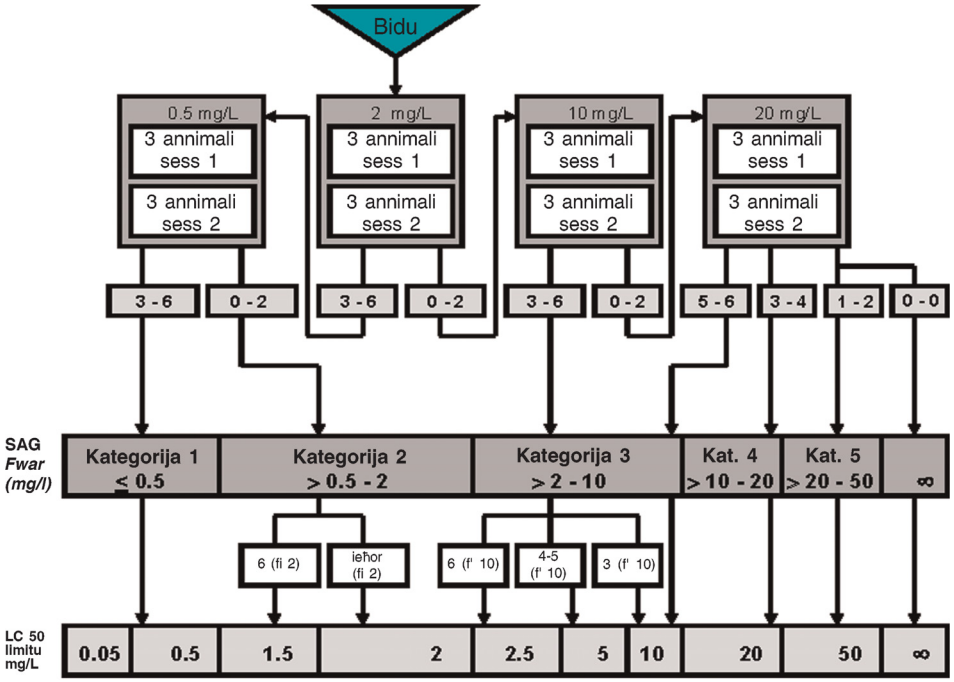
- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 3b

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 2 mg/L/4h għall-fwar



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0–6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

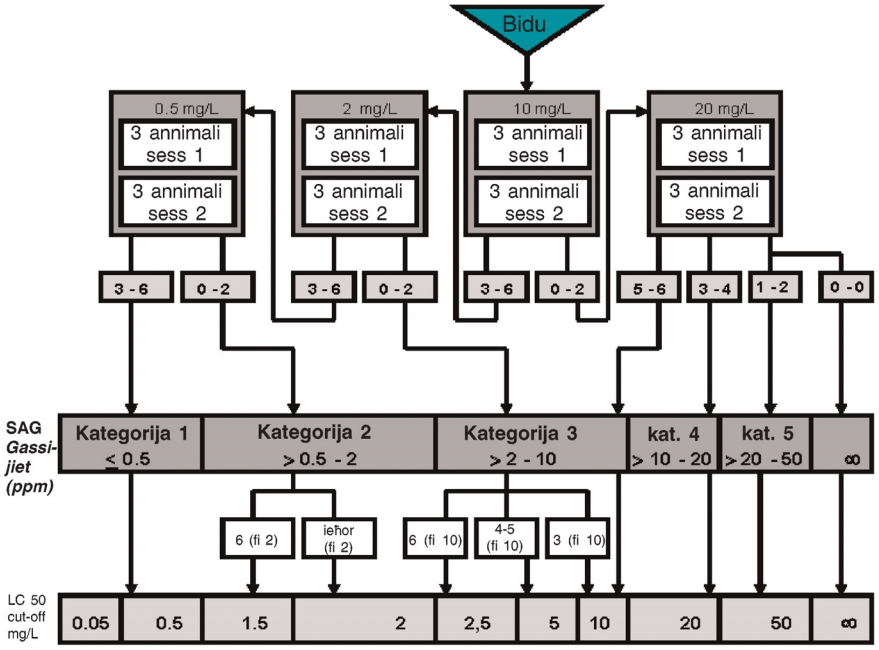
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 3c

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 10 mg/L/4h għall-fwar



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0–6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

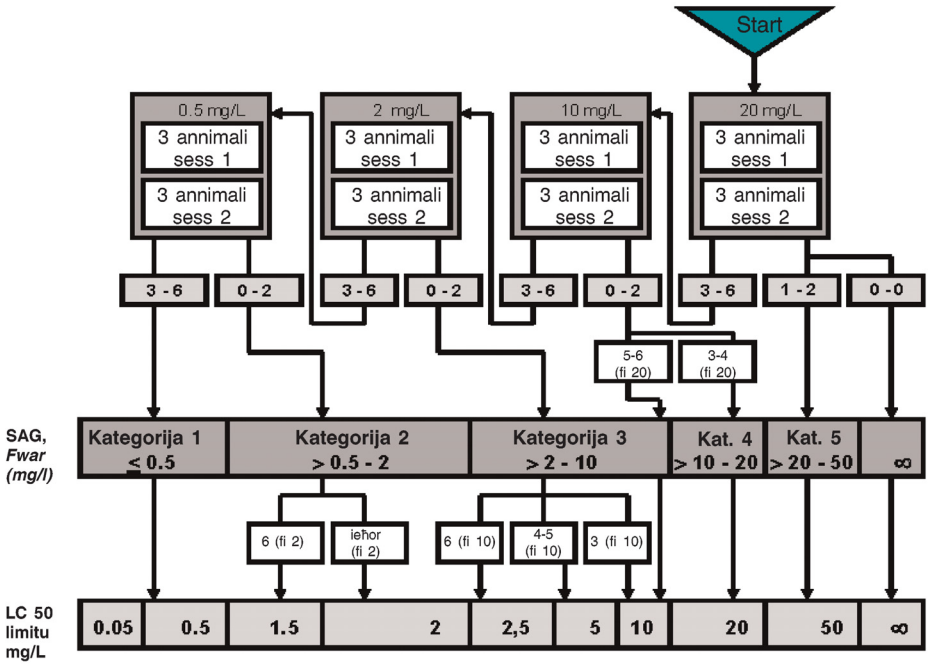
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 3d

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 20 mg/L/4h għall-fwar



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

— Ittestjat fi ≥ 50 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 4

Proċedura li għandha tkun segwita minn kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-bidu għal aerosols (mg/l/4h)

Rimarki ġenerali ([1])

Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu, l-iskemi rispettivi ta' ttestjar kif inklużi f'dan l-Appendiċi jagħtu profil tal-proċedura li għandha tkun segwita.

Appendiċi 4a: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,05 mg/l

Appendiċi 4b: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,5 mg/l

Appendiċi 4c: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 1 mg/l

Appendiċi 4d: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 5 mg/l

Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

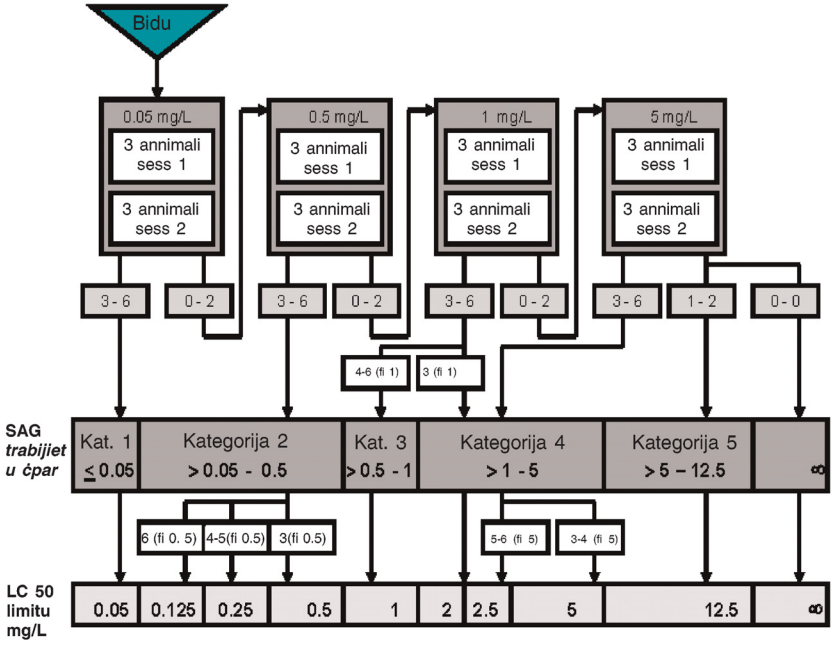
([1]) Fit-tabelli li ġejjin qed issir referenza għall-GHS (Sistema Globali Armonizata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossiċità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼M4

Appendiċi 4a

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 0,05 mg/L/4h għall-fwar



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

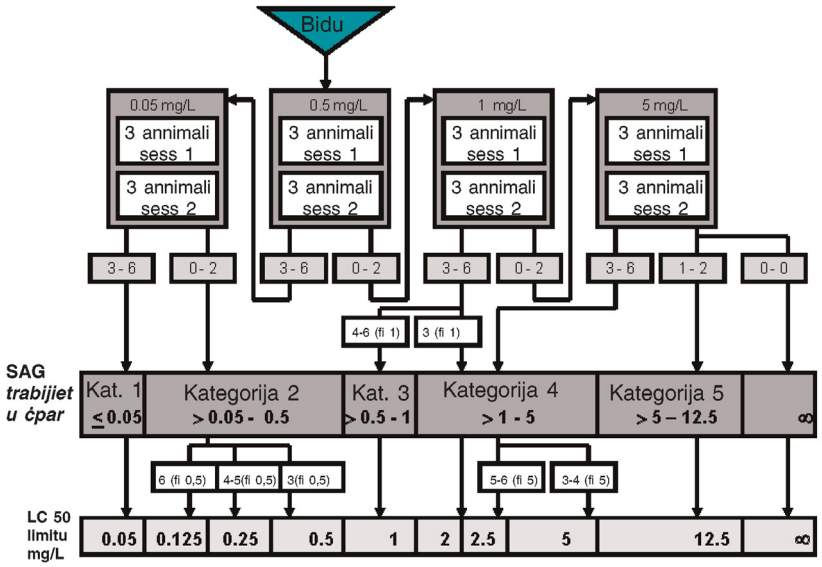
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 4b

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwalib'konċentrazzjonital-bidu ta' 0,5 mg/L/4h għall-aerosoli



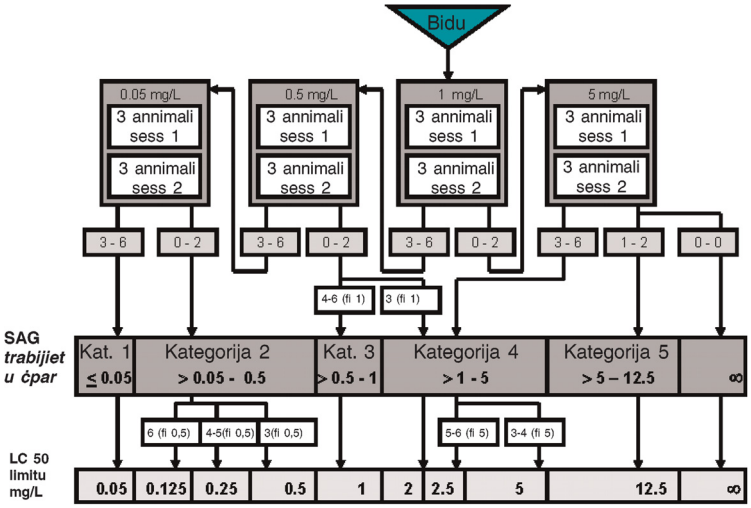
— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
— SAG: Sistema Armonizzata Globalment
— ∞: mhux ikklassifikat
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 4c

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwalib'konċentrazzjonital-bidu ta' 1 mg/L/4h għall- aerosoli



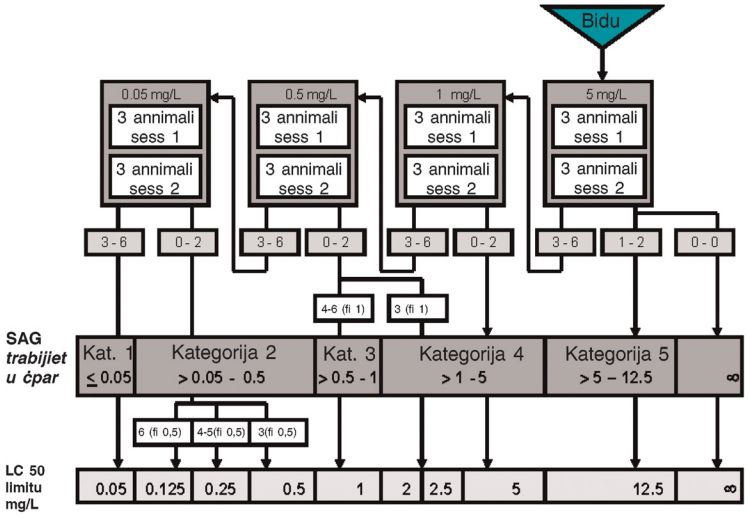
— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
— SAG: Sistema Armonizzata Globalment
— ∞: mhux ikklassifikat
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 4d

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 5 mg/L/4h g ħall-aerosoli



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
— SAG: Sistema Armonizzata Globalment
— ∞: mhux ikklassifikat
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)"

▼M5

B.53. **STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSIĊITÀ TAL-IŻVILUPP**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar it-Testijiet (TG) tal-OECD Nru 426 (2007). F'Ġunju 1995 f'Kopenħagen, Grupp ta' Ħidma tal-OECD dwar it-Tossiċità Riproduttiva u tal-Iżvilupp tħaddet dwar il-ħtieġa li jiġu aġġornati l-linji gwida eżistenti tal-OECD dwar it-testijiet għat-tossiċità riproduttiva u tal-iżvilupp, u l-iżvilupp ta' linji gwida ġodda għall-punti aħħarin li għadhom mhumiex koperti (1). Il-grupp ta' ħidma rrakkomanda li l-linja gwida dwar it-testijiet għan-newrotossiċità tal-iżvilupp għandhom jinkitbu fuq il-bażi ta' linja gwida tal-EPA tal-Istati Uniti, li minn dak iż-żmien 'l hawn ġiet riveduta (2). F'Ġunju 1996, saret it-tieni laqgħa ta' konsultazzjoni f'Kopenħagen biex is-Segretarjat jiġi pprovdut bi gwida fuq ir-riżultat ta' linja gwida ġdida dwar it-testijiet dwar in-newrotossiċità tal-iżvilupp, inklużi l-elementi ewlenin, eż., dettalji dwar l-għażla tal-ispeċi ta' annimal, il-perjodu ta' dożaġġ, il-perjodu ta' ttestjar, il-punti aħħarin li għandhom jiġu vvalutati, u l-kriterji għall-evalwazzjoni tar-riżultati. Fl-1998 ġiet ippubblikata linja gwida tal-Istati Uniti dwar valutazzjoni tar-riskju ta' newrotossiċità (3). F'Ottubru 2000 l-ewwel saret Laqgħa ta' Konsultazzjoni tal-Esperti tal-OECD u mbagħad wara sar Workshop tal-Istitut tax-Xjenza tar-Riskji tal-ILSI u fl-2005 saret laqgħa ta' konsultazzjoni tal-esperti f'Tokjo. Dawn il-laqgħat saru biex jiġu diskussi l-kwistjonijiet xjentifiċi u tekniċi relatati mal-linja gwida kurrenti dwar it-testijiet u r-rakkomandazzjonijiet mil-laqgħat (4)(5)(6)(7) ġew ikkunsidrati fl-iżvilupp ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Iktar informazzjoni dwar il-kondotta, l-interpretazzjoni u t-terminoloġija użata għal dan il-metodu ta' ttestjar tista' tinkiseb mid-Dokumenti ta' Gwida tal-OECD Nru 43 dwar l-"Ittestjar u l-Valutazzjoni tat-Tossiċità Riproduttiva" (8) u Nru 20 dwar l-"Ittestjar tan-Newrotossiċità"(9).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

2. Hemm numru ta' sustanzi kimiċi li huma magħrufin li jipproduċu effetti newrotossiċi tal-iżvilupp fil-bniedem u speċi oħrajn (10)(11)(12)(13). Id-determinazzjoni tal-potenzjal għan-newrotossiċità tal-iżvilupp jaf tkun meħtieġa biex jiġu vvalutati u evalwati l-karatteristiċi tossiċi ta' sustanza kimika. L-istudji dwar in-newrotossiċità tal-iżvilupp huma mfasslin sabiex jipprovdu dejta, inklużi karatterizzazzjonijiet tar-rispons għad-doża, dwar l-effetti funzjonali u morfoloġiċi potenzjali fuq is-sistema nervuża fi żvilupp tal-ulied li jistgħu jfeġġu minn esponiment fl-utru u kmieni fil-ħajja.

3. Studju dwar in-newrotossiċità tal-iżvilupp jista' jsir bħala studju separat, inkorporat fi studju dwar it-tossiċità riproduttiva u/jew dwar in-newrotissiċità fl-adulti (eż.,, il-metodi ta' ttestjar B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)), jew jiżdied ma' studji dwar it-tossiċità tal-iżvilupp qabel it-twelid (eż., il-metodu ta' ttestjar B.31 (17)). Meta l-istudju dwar in-newrotossiċità tal-iżvilupp ikun inkorporat fi ħdan jew ikun marbut ma' studju ieħor, importanti li tinżamm l-integrità taż-żewġ tipi ta' studju. L-ittestjar kollu għandu jikkonforma mal-leġiżlazzjoni applikabbli jew il-linji gwida tal-gvern u istituzzjonali għall-użu ta' annimali tal-laboratorju fir-riċerka (eż., 18).

4. Il-laboratorju tat-testijiet għandu jqis l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test qabel ma jagħmel l-istudju. It-tali informazzjoni ser tinkludi l-identità u l-istruttura tas-sustanza kimika; il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ieħor *in vitro* jew *in vivo* dwar it-tossiċità fuq is-sustanza kimika; dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati; u l-użu/i antiċipat(i) tas-sustanza kimika. Din l-informazzjoni hija neċessarja biex dawk kollha kkonċernati jkunu ssodisfati li t-test huwa rilevanti għall-protezzjoni tas-saħħa tal-bniedem, u ser tgħin fl-għażla ta' doża ta' bidu xierqa.

▼M5

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

5. Is-sustanza kimika tat-test tingħata lill-annimali matul it-tqala u t-treddigħ. L-ommijiet jiġu ttestjati biex jiġu vvalutati l-effetti f'nisa tqal u li qed ireddgħu u dan jista' jipprovdi wkoll informazzjoni komparattiva (ommijiet versus ulied). L-ulied jingħażlu b'mod aleatorju minn fost il-boton għal evalwazzjoni tan-newrotossiċità. L-evalwazzjoni tikkonsisti f'osservazzjonijiet biex jiġu identifikati anormalitajiet grossi fis-sistema newroloġika jew fl-imġiba, inkluża l-valutazzjoni tal-iżvilupp fiżiku, l-ontoġenija tal-imġiba, l-attività motorja, il-funzjoni motorja u sensorjali, u t-tagħlim u l-memorja; u l-evalwazzjoni tal-piżijiet tal-moħħ u n-newropatoloġija matul l-iżvilupp ta' wara t-twelid u l-fażi adulta.

6. Meta l-metodu ta' ttestjar jitwettaq bħala studju separat, jistgħu jintużaw annimali disponibbli addizzjonali f'kull grupp għal proċeduri speċifiċi relatati man-newromġiba, in-newropatoloġija, in-newrokimika jew l-elettrofiżjoloġija li jitstgħu jżidu mad-dejta miksuba mill-analiżijiet rakkomandati minn dan il-metodu ta' ttestjar (16)(19)(20)(21). Il-proċeduri supplimentari jistgħu jkunu partikolarment utli meta osservazzjoni empirika, effetti antiċipati, jew mekkaniżmu/modalità ta' azzjoni jindikaw tip speċifiku ta' newrotossiċità. Dawn il-proċeduri supplimentali jistgħu jintużaw fl-ommijiet kif ukoll fil-frieħ. Barra minn hekk, proċeduri *ex vivo* jew *in vitro* jistgħu jintużaw ukoll, diment li dawn il-proċeduri ma jibdlux l-integrità tal-proċeduri *in vivo*.

TĦEJJIJIET GĦAT-TEST

L-għażla tal-ispeċi tal-annimali

7. L-ispeċi ppreferuta għat-test hija l-far; jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn meta jkunu xierqa. Madankollu, il-jiem ta' tqala u ta' wara t-twelid speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma speċifiċi għal razez użati spiss ta' firien, u għandhom jingħażlu jiem komparabbli jekk tintuża speċi differenti jew razza mhux tas-soltu. L-użu ta' speċijiet oħrajn għandu jkun iġġustifikat fuq il-bażi ta' dejta tossikoloġika, farmakokinetika, u/jew oħra. Il-ġustifikazzjoni għandha tinkludi d-disponibilità ta' valutazzjonijiet tan-newromġiba u n-newropatoloġija ta' wara t-twelid speċifiċi għall-ispeċijiet. Jekk kien hemm test preċedenti li qajjem tħassib, għandhom jiġu kkunsidrati l-ispeċi/ir-razza li qajmu tħassib. Minħabba l-attributi ta' prestazzjoni li jvarjaw ta' razez ta' firien differenti, għandu jkun hemm evidenza li r-razza magħżula sabiex tintuża għandha fekondità u risponsività adegwati. L-affidabilità u s-sensittività ta' speċijiet oħrajn biex tiġi identifikata newrotossiċità tal-iżvilupp għandhom jiġu dokumentati.

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-għalf

8. It-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperimenti għandha tkun 22 ± 3 °C. Filwaqt li l-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 % minbarra matul it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Huwa possibbli wkoll li jinqeleb iċ-ċiklu tad-dawl qabel it-tgħammir u għad-durata tal-istudju, sabiex isiru valutazzjonijiet tal-punti aħħarin funzjonali u tal-imġiba matul il-perjodu mudlam (taħt dawl aħmar), jiġifieri fil-ħin li matulu normalment l-annimali jkunu attivi (22). Kwalunkwe bidla fiċ-ċiklu tad-dawl-dlam għandha tinkludi ħin adegwat biex dan iċ-ċiklu jindera ħalli l-annimali jkunu jistgħu jadattaw għaċ-ċiklu l-ġdid. Għall-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tajjeb għax-xorb. It-tip ta' ikel u ilma għandu jiġi rrapportat u t-tnejn li huma għandhom jiġu analizzati għal kontaminanti.

▼M5

9. L-annimali jistgħu jitqiegħdu f'post waħedhom jew f'gaġġa fi gruppi żgħar tal-istess sess. Il-proċeduri ta' tgħammir għandhom jitwettqu f'gaġeġ adattati għall-iskop. Wara evidenza ta' kopulazzjoni jew mhux iktar minn 15-il jum ta' tqala, l-annimali mgħammrin għandhom jitqiegħdu f'gaġeġ separati f'gaġeġ tal-ħlas jew tal-maternità. Il-gaġeġ għandhom jiġu rranġati b'tali mod li jkunu minimizzati l-effetti possibbli minħabba l-pożizzjoni tal-gaġġa. L-annimali nisa mgħammrin għandhom jingħataw materjal tat-tibjit xieraq u definit meta jkunu waslu biex iwelldu. Huwa magħruf b'mod ġenerali li tqandil mhux kif suppost jew stress matul it-tqala jista' jirriżulta f'riżultati avversi, inkluż korriment jew żvilupp alterat tal-fetu u wara t-twelid. Bħala protezzjoni kontra telf ta' feti minħabba fatturi li mhumiex relatati mal-kura, l-annimali għandhom jitqandlu bir-reqqa matul it-tqala, u għandu jiġi evitat stress minn fatturi esterni bħal storbju żejjed fuq barra.

Tħejjija tal-annimali

10. Għandhom jintużaw annimali b'saħħithom, li draw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju u li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali fl-imgħoddi, sakemm l-istudju ma jkunx inkorporat fi studju ieħor (ara l-paragrafu 3). L-annimali tat-test għandhom jiġu karatterizati għall-ispeċi, ir-razza, is-sors, is-sess, il-piż u l-età. Kull annimal għandu jkun assenjat u jiġi mmarkat b'numru uniku ta' identifikazzjoni. Sa fejn dan ikun prattikabbli, l-annimali tal-gruppi kollha tat-test għandhom ikunu tal-istess piż u età u fi ħdan il-medda normali tal-ispeċi u r-razza studjata. F'kull livell ta' doża għandhom jintużaw annimali nisa żgħażagħ li qatt ma welldu. Aħwa ma għandhomx jitgħammru, u għandha tinxteħet attenzjoni biex dan jiġi żgurat. Il-Jum tat-Tqala (GD) 0 huwa l-jum li fih ikunu osservati l-plakka vaġinali u/jew l-isperma. Għandu jingħata ħin adegwat ta' akklimatizzazzjoni (eż., 2-3 ijiem) meta jinxtraw annimali tqal minn fornitur. L-annimali tqal għandhom jiġu assenjati b'mod ħieles minn preġudizzji fil-gruppi ta' kontroll u kura, u sa fejn dan ikun possibbli, għandhom jitqassmu ndaqs bejn il-gruppi (eż., proċedura aleatorja stratifikata hija rakkomandata biex tkun ipprovduta distribuzzjoni ndaqs fost il-gruppi kollha, bħal dik ibbażata fuq il-piż tal-ġisem). L-annimali nisa inseminati mill-istess raġel għandhom jitqassmu ndaqs bejn il-gruppi.

PROĊEDURA

In-numru u s-sess tal-annimali

11. Kull grupp tat-test u ta' kontroll għandu jkun fih numru suffiċjenti ta' annimali nisa tqal li jridu jkunu esposti għas-sustanza kimika tat-test biex jiġi żgurat li jiġi prodott numru suffiċjenti ta' ulied għal evalwazzjoni tan-newrotossiċità. Huwa rakkomandat totali ta' 20 boton f'kull livell ta' doża. Disinji tad-dożaġġ tal-grupp 'staggered' u tar-replikati huma awtorizzati jekk jintlaħqu n-numri totali ta' boton f'kull grupp, u jekk jintużaw mudelli statistiċi xierqa biex jagħtu kont għar-replikati.

12. Dakinhar tal-jum wara t-twelid (PND) 4 jew qabel (il-jum tal-ħlas huwa PND 0), id-daqs ta' kull boton għandu jkun aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda permezz ta' għażla aleatorja biex jinħareġ daqs tal-boton uniformi għall-frieħ kollha (23). Id-daqs tal-boton ma għandux jaqbeż id-daqs medju tal-boton għar-razza ta' rodituri użata (8-12). Il-boton għandu jkollhom, kemm jista' jkun, numri ndaqs ta' frieħ irġiel u nisa. L-eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż.,, fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem, mhijiex xierqa. Wara l-istandardizzazzjoni tal-boton (qtil għat-tnaqqis) u qabel iktar testijiet tal-punti aħħarin funzjonali, il-frieħ individwali li huma skedati għal testijiet ta' qabel il-ftim jew wara l-ftim għandhom jiġu identifikati b'mod uniku, billi jintuża kwalunkwe metodu umanitarju xieraq għall-identifikazzjoni tal-frieħ (eż., 24).

▼M5

L-assenjament ta' annimali għal testijiet funzjonali u tal-imġiba, piżijiet tal-moħħ, u evalwazzjonijiet newropatoloġiċi

13. Il-metodu ta' ttestjar jippermetti li jittieħdu diversi approċċi fir-rigward tal-assenjament tal-annimali esposti *in utero* u permezz ta' treddigħ għal testijiet funzjonali u tal-imġiba, maturità sesswali, determinazzjoni tal-piż tal-moħħ, u evalwazzjoni newropatoloġika (25). Jistgħu jiżdiedu wkoll testijiet oħrajn tal-funzjoni tan-newromġiba (eż., l-imġiba soċjali), in-newrokimika jew in-newropatoloġija fuq bażi ta' każ b'każ, diment li ma tkunx kompromessal-integrità tat-testijiet oriġinali meħtieġa.

14. Il-frieħ jingħażlu minn kull grupp ta' doża u jiġu assenjati għal valutazzjonijiet tal-punti aħħarin fil-PND 4 jew wara. L-għażla tal-frieħ għandha ssir b'tali mod li ż-żewġ sessi minn kull boton f'kull grupp ta' doża jkunu rappreżentati ndaqs fit-testijiet kollha kemm jista' jkun. Għall-ittestjar tal-attività motorja, l-istess par ta' frieħ irġiel u nisa għandhom jiġu ttestjati fl-etajiet kollha ta' qabel il-ftim (ara l-paragrafu 35). Għat-testijiet kollha l-oħrajn, l-istess pari ta' annimali rġiel u nisa jew oħrajn separati jistgħu jiġu assenjati f'testijiet tal-imġiba differenti. Frieħ differenti jistgħu jkunu jeħtieġu li jiġu assenjati għal testijiet ta' frieħ li għadhom kif infatmu versus adult tal-funzjoni konjittiva sabiex jiġi evitat it-tfixkil tal-effetti tal-età u t-taħriġ minn qabel f'dawk il-kejliet (26)(27). Fil-ftim (PND 21), il-frieħ li ma jingħażlux għall-ittestjar jistgħu jinqatlu b'mod dinjituż. Kwalunkwe alterazzjoni fl-assenjamenti tal-frieħ għandha tiġi rrapportata. L-unità ta' kejl statistika għandha tkun il-boton (jew l-omm) u mhux il-grupp.

15. Hemm modi differenti ta' kif frieħ jiġu assenjati għal-eżamijiet, testijiet konjittivi, eżamijiet patoloġiċi ta' qabel u wara l-ftim, eċċ., (ara l-Figura 1 għad-disinn ġenerali u l-Appendiċi 1 għal eżempji ta' assenjament). In-numri minimi rakkomandati ta' annimali f'kull grupp ta' doża għal eżamijiet ta' qabel u wara l-ftim huma kif ġejjin:

Osservazzjonijiet kliniċi u piż tal-ġisem	L-annimali
Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati	20/sess (1/sess/boton)
Piż tal-moħħ (wara l-fissazzjoni) PND 11-22	10/sess (1/boton)
Piż tal-moħħ (mhux fissat) ~ PND 70	10/sess (1/boton)
Newropatoloġija (fissazzjoni b'immersjoni jew b'perfusjoni) PND 11-22	10/sess (1/boton)
Newropatoloġija (fissazzjoni b'perfusjoni) PND ~70	10/sess (1/boton)
Maturità sesswali	20/sess (1/sess/boton)
Fażijiet oħrajn fl-iżvilupp (fakultattiva)	L-annimali kollha
Ontoġenija tal-imġiba	20/sess (1/sess/boton)
Attività motorja	20/sess (1/sess/boton)
Funzjoni motorja u sensorja	20/sess (1/sess/boton)
Tagħlim u memorja	10/sess ([a]) (1/boton)

([a]) Skont is-sensittività tat-testijiet tal-funzjoni konjittiva, għandha tiġi kkunsidrata investigazzjoni ta' numru kbir u ogħla ta' annimali, eż., sa annimal raġel wieħed u annimal mara waħda għal kull boton (għall-assenjamenti tal-annimali ara l-Appendiċi 1) (gwida ulterjuri dwar id-daqs tal-kampjun hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 (8)).

▼M5

Dożaġġ

16. Għandhom jintużaw tal-inqas tliet livelli ta' dożi u kontroll konkurrenti. Il-livelli ta' doża għandhom ikunu distanti biżżejjed biex tinħoloq gradazzjoni tal-effetti tossiċi. Sakemm ma jkunx limitat mill-għamla fiżikokimika jew il-proprjetajiet bijoloġiċi tas-sustanza kimika, l-ogħla livell ta' doża għandu jingħażel bl-għan li jikkaġuna xi tossiċità materna (eż.,, sinjali kliniċi, tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-ġisem (mhux iktar minn 10 %) u/jew evidenza ta' tossiċità li tillimita d-doża f'organu fil-mira). Id-doża għolja tista' tkun limitata għal 1 000 mg/kg/jum tal-piż tal-ġisem, b'xi eċċezzjonijiet. Pereżempju, l-esponiment mistenni tal-bniedem tista' tindika l-bżonn li jintuża livell ogħla ta' doża. Inkella għandhom isiru studji pilota jew studji preliminari ta' sejbien tal-medda biex jiġi determinat l-ogħla dożaġġ li għandu jipproduċi grad minimu ta' tossiċità materna. Jekk intwera li s-sustanza kimika tat-test hija tossika għall-iżvilupp fi studju standard tat-tossiċità tal-iżvilupp jew fi studju pilota, l-ogħla livell tad-doża għandu jkun id-doża massima li ma tikkaġunax tossiċità eċċessiva fl-ulied, jew mewt jew malformazzjonijiet *in utero* jew neonatali, biżżejjed biex tkun prekluża evalwazzjoni sinifikanti ta' newrotossiċità. L-inqas livell ta' doża għandu jkollu l-għan li ma jipproduċi ebda evidenza ta' tossiċità materna jew tal-iżvilupp, inkluża newrotossiċità. Għandha tingħażel sekwenza dixxendenti ta' livelli ta' doża bilgħan li jintwera kwalunkwe rispons relatat mad-doża u Livell ta' Effett Avvers Mhux Osservat (NOAEL), jew dożi qrib il-limitu ta' identifikazzjoni li jippermettu li tiġi determinata doża ta' riferiment. Intervalli maqsuma fi tnejn sa erbgħa spiss ikunu ottimali sabiex jiġu stabbiliti l-livelli ta' doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' doża spiss ikun ippreferut iktar mill-użu ta' intervalli kbar ħafna (eż., iktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

17. Il-livelli ta' doża għandhom jingħażlu filwaqt li tittieħed f'kunsiderazzjoni d-dejta eżistenti kollha dwar it-tossiċità kif ukoll l-informazzjoni addizzjonali dwar il-metaboliżmu u t-tossikokinetika tas-sustanza kimika tat-test jew materjali relatati. Din l-informazzjoni tista' tgħin ukoll biex turi l-adegwatezza tal-iskeda tad-dożaġġ. Id-dożaġġ dirett tal-frieħ għandu jitqies fuq il-bażi tal-esponiment u l-informazzjoni farmakokinetika (28)(29). Għandhom jittieħdu f'kunsiderazzjoni bir-reqqa l-benefiċċji u l-iżvantaġġi qabel ma jsiru studji tad-dożaġġ dirett (30).

18. Il-grupp ta' kontroll konkurrenti għandu jkun grupp ta' kontroll b'kura finta jew grupp ta' kontroll b'veikolu jekk jintuża veikolu fl-għoti tas-sustanza kimika. Normalment l-annimali għandhom jingħataw l-istess volum ta' sustanzi kimiċi jew veikolu tat-test fuq bażi ta' piż tal-ġisem. Jekk jintuża veikolu jew addittiv ieħor biex jiġi faċilitat id-dożaġġ, għandhom jittieħdu f'kunsiderazzjoni l-karatteristiċi li ġejjin: l-effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu jew iż-żamma tas-susanza kimika tat-test; effetti fuq il-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' ikel jew ilma jew l-istatus nutrizzjonali tal-annimali. Il-veikolu ma għandux jikkaġuna effetti li jistgħu jfixklu l-interpretazzjoni tal-istudju u la għandu jkun tossiku għannewromġiba u lanqas ma għandu jkollu effetti fuq ir-riproduzzjoni jew l-iżvilupp. Għal veikoli ġodda, għandu jkun inkluż grupp ta' kontroll b'kura finta minbarra grupp ta' kontroll bil-veikolu. L-annimali fil-grupp(i) ta' kontroll għandhom jiġu ttrattati bl-istess mod bħall-annimali tal-grupp tat-test.

▼M5

L-għoti ta' doża

19. Is-sustanza kimika jew il-veikolu tat-test għandhom jingħataw bl-iktar rotta rilevanti għall-esponiment potenzjali tal-bniedem, u fuq il-bażi ta' informazzjoni disponibbli dwar il-metaboliżmu u d-distribuzzjoni fl-annimali tat-test. Is-soltu, ir-rotta tal-amministrazzjoni tkun orali (eż.,gavage, djetetika, permezz ta' ilma tax-xorb), iżda jistgħu jintużaw rotot oħrajn (eż., dermali, teħid man-nifs) skont il-karatteristiċi u r-rotot ta' esponiment antiċipati jew magħrufin għall-bniedem (gwida ulterjuri hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida 43(8)). Għandha tkun ipprovduta ġustifikazzjoni għar-rotta tal-amministrazzjoni magħżula. Is-sustanza kimika tat-test għandha tingħata kuljum bejn wieħed u ieħor fl-istess ħin tal-ġurnata.

20. Normalment, id-doża mogħtija lil kull annimal għandha tkun ibbażata fuq l-iktar determinazzjoni riċenti tal-piż tal-ġisem individwali. Madankollu, meta d-doża jiġu aġġustati matul l-aħħar terz tat-tqala, dan għandu jsir bir-reqqa. Jekk tiġi osservata tossiċità eċċessiva fl-ommijiet ikkurati, dawk l-annimali għandhom jinqatlu b'mod dinjituż.

21. Bħala minimu, is-sustanza kimika jew il-veikolu tat-test għandhom jingħataw kuljum lil annimali nisa mgħammrin mill-ħin tal-impjant (GD 6) sat-treddigħ (PND 21), sabiex il-ħrief ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test matul l-iżvilupp newroloġiku ta' qabel u wara t-twelid. L-età li fiha jibda d-dożaġġ, u d-durata u l-frekwenza tad-dożaġġ, jistgħu jiġu aġġustati jekk l-evidenza tappoġġja disinn sperimentali iktar rilevanti għal esponimenti tal-bniedem. Id-durati tad-dożaġġ għandhom ikunu aġġustati għal speċijiet oħrajn biex jiġi żgurat esponiment matul il-perjodi bikrin kollha tal-iżvilupp tal-moħħ (jiġifieri ekwivalenti għal tkabbir tal-moħħ tal-bniedem ta' qabel it-twelid u kmiem wara t-twelid). Id-dożaġġ jista' jibda mill-bidu tat-tqala (GD 0) għad li għandu jittieħed f'kunsiderazzjoni l-potenzjal li s-sustanza kimika tat-test tikkaġuna telf ta' qabel l-impjant. Amministrazzjoni li tibda f'GD 6 tevita dan ir-riskju, iżda l-istadji ta' żvilupp bejn GD 0 u 6 ma jkunux ikkurati. Meta laboratorju jixtri annimali mgħammrin biż-żmien, ikun imprattiku li d-dożaġġ jinbeda minn GD 0, u b'hekk GD 6 ikun jum ta' bidu tajjeb. Il-laboratorju tat-test għandu jfassal l-iskeda tad-dożaġġ skont l-informazzjoni rilevanti dwar l-effetti tas-sustanza kimika tat-test, l-esperjenza fl-imgħoddi, u kunsiderazzjonijiet loġistiċi; dan jista' jinkludi estensjoni tad-dożaġġ wara l-ftim. Id-dożaġġ ma għandux iseħħ dakinhar tal-ħlas f'dawk l-annimali li ma jkunux għadhom welldu l-ulied tagħhom kompletament. B'mod ġenerali, huwa supponut li l-esponiment tal-frieħ ser isseħħ permezz tal-ħalib matern; madankollu, dożaġġ dirett tal-frieħ għandu jiġi kkunsidrat f'dawk il-każijiet fejn hemm nuqqas ta' evidenza ta' esponiment issuktat għall-ulied. L-evidenza tal-esponiment kontinwu tista' tinkiseb minn eż.,, informazzjoni farmakokinetika, tossiċità tal-ulied jew bidliet fil-bijoswieq (28).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet tal-ommijiet

22. L-ommijiet kollha għandhom jiġu osservati bir-reqqa tal-inqas darba kuljum fir-rigward tal-kundizzjoni tas-saħħa tagħhom, inkluża l-morbidità u l-mortalità.

23. Matul il-perjodi tal-kura u l-osservazzjoni, b'mod perjodiku għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi iktar dettaljati (tal-inqas darbtejn matul il-perjodu tad-dożaġġ fit-tqala u darbtejn matul il-perjodu ta' dożaġġ fit-treddigħ) billi tal-inqas jintużaw għaxar ommijiet għal kull livell ta' doża. L-annimali għandhom ikunu osservati barra l-gaġġa oriġinali minn tekniċi mħarrġin li ma jafux bil-kura tal-annimali, billi jintużaw proċeduri standardizzati ħalli jiġi minimizzat l-istress tal-annimali u l-preġudizzju tal-osservaturi, u tiġi massimizzata l-affidabilità bejn l-osservaturi. Meta dan ikun possibbli, huwa rakkomandat li l-osservazzjonijiet fi studju partikolari jsiru mill-istess tekniku.

▼M5

24. Il-preżenza tas-sinjali osservati għandha tiġi rreġistrata. Kull meta dan ikun possibbli, anki l-kobor tas-sinjali osservati għandu jiġi rreġistrat. L-osservazzjonijiet kliniċi għandhom jinkludu, iżda ma għandhomx ikunu limitati għal, bidliet fil-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukuża, l-okkorrenza ta' tnixxijiet, u l-attività awtonomika (eż., dmugħ, piloerezzjoni, daqs tal-ħabba, xejra respiratorja mhux tas-soltu u/jew teħid tan-nifs bil-ħalq, u kwalunkwe sinjal mhux tas-soltu ta' urina jew rawt).

25. Kwalunkwe rispons mhux tas-soltu fir-rigward ta' pożizzjoni tal-ġisem, livell ta' attività (eż., esplorazzjoni mnaqqsa jew miżjuda taż-żona standard) u koordinazzjoni tal-moviment għandhom jiġu osservati. Bidliet fil-mixja, (eż., imferċħa, atassja), qagħda (eż., ħotba) u r-reattività għat-tqandil, it-tqegħid jew stimuli ambjentali oħrajn, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, konvulżjonijiet, rogħda, sterjotipi (eż.,mixmut wisq, ċaqliq tar-ras mhux tas-soltu, tidwir ripetittiv), imġiba mhux tas-soltu (eż., gdim jew lagħaq eċċessiv, awtomutilazzjoni, mixi lura, tleħħin), jew aggressjoni għandhom jiġu rreġistrati.

26. Sinjali ta' tossiċità għandhom jiġu rreġistrati, inkluż il-jum tal-bidu, il-ħin tal-ġurnata, il-grad, u d-durata.

27. L-annimali għandhom jiġu ppeżati fil-ħin tad-dożaġġ tal-inqas darba fil-ġimgħa matul l-istudju, darkinkhar jew qrib il-jum tal-ħlas, u fil-PND 21 (ftim). Għall-istudji ta' gavage, l-ommijiet għandhom jintiżnu tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa. Id-dożi għandhom ikunu aġġustati fil-ħin ta' kull determinazzjoni tal-piż tal-ġisem, kif xieraq. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel kull ġimgħa tal-inqas matul it-tqala u t-treddigħ. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel tal-inqas darba fil-ġimgħa jekk l-esponiment ikun permezz tal-provvista tal-ilma.

L-osservazzjonijiet fuq ulied

28. L-ulied kollha għandhom jiġu osservati bir-reqqa tal-inqas darba kuljum għal sinjali ta' tossiċità u għall-morbilità u l-mortalità.

29. Matul il-perjodi tal-kura u l-osservazzjoni, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi iktar dettaljati tal-ulied. L-ulied (tal-inqas ferħ/sess/boton wieħed) għandhom ikunu osservati minn tekniċi mħarrġin li ma jafux bil-kura tal-annimali, billi jużaw proċeduri standardizzati biex jiġi minimizzat il-preġudizzju u tiġi massimizzata l-affidabilità bejn l-osservaturi. Meta dan ikun possibbli, huwa rakkomandat li l-osservazzjonijiet isiru mill-istess tekniku. Bħala minimu, il-punti aħħarin deskritti fil-paragrafi 24 u 25 għandhom jiġu ssorveljati kif xieraq għall-istadju tal-iżvilupp taħt osservazzjonijiet.

30. Is-sinjali kollha ta' tossiċità fl-ulied għandhom ikunu rreġistrati, inkluż il-jum tal-bidu, il-ħin tal-ġurnata, il-grad u d-durata.

Fażijiet fiżiċi u tal-iżvilupp

31. Bidliet fil-fażijiet ta' żvilupp ta' qabel il-ftim (eż., ftuħ tal-pinna, ftuħ tal-għajnejn, spuntar tal-inċiż) huma ferm korrelatati mal-piż tal-ġisem (30)(31). Il-piż tal-ġisem jista' jkun l-aħjar indikatur ta' żvilupp fiżiku. Għaldaqstant, il-kejl tal-fażijiet ta' żvilupp huwa rakkomandat biss meta jkun hemm evidenza minn qabel ta' dawn il-punti aħħarin ser jipprovdu informazzjoni addizzjonali. Il-puntwalità għall-valutazzjoni ta' dawn il-parametri hija indikata fit-Tabella 1. Skont l-effetti antiċipati, u r-riżultati tal-kejliet inizjali, jista' jkun rakkomandabbli li jiżdiedu punti tal-ħin addizzjonali jew li l-kejliet isiru fi stadji oħrajn tal-iżvilupp.

▼M5

32. Huwa rakkomandat li tintuża l-età ta' wara l-att sesswali minflok l-età ta' wara t-twelid meta jiġi vvalutat l-iżvilupp fiżiku (33). Jekk il-frieħ jiġu ttestjati dakinhar tal-ftim, huwa rakkomandat li dan l-ittestjar isir qabel il-ftim propju biex jiġi evitat effett ta' konfużjoni mill-istress marbut mal-ftim. Barra minn hekk, kwalunkwe ttestjar ta' wara l-ftim tal-frieħ ma għandux iseħħ matul il-jumejn ta' wara l-ftim.

Tabella 1

Il-puntwalità tal-valutazzjoni tal-fażijiet fiżiċi u tal-iżvilupp, u punti aħħarin funzjonali/tal-imġiba ([a])

Perjodi tal-Età / Punti Aħħarin	Qabel il-ftim ([b])	Adolexxenza ([b])	Żgħażagħ ([b])
Fażijiet fiżiċi u tal-iżvilupp			
Piż tal-Ġisem u Osservazzjonijiet Kliniċi	fil-ġimgħa ([c])	tal-inqas kull ġimgħatejn	tal-inqas kull ġimgħatejn
Piż tal-moħħ	PND 22 ([d])		fit-terminazzjoni
Newropatoloġija	PND 22 ([d])		fit-terminazzjoni
Maturità sesswali	—	kif xieraq	—
Fażijiet oħrajn tal-iżvilupp ([e])	kif xieraq	—	—
Punti aħħarin funzjonali/tal-imġiba			
Ontoġenija tal-imġiba	Tal-inqas żewġ kejliet		
Attività motorja (inkluża d-drawwa)	1–3 darbiet ([f])	—	darba
Funzjoni motorja u sensorjali	—	darba	darba
Tagħlim u memorja	—	darba	darba

([a]) Din it-tabella tippreżenta n-numru minimu ta' drabi meta għandhom isiru l-kejliet. Skont l-effetti antiċipati, u r-riżultati tal-kejliet inizjali, jista' jkun rakkomandabbli li jiżdiedu punti ta' żmien addizzjonali (eż., annimali mdaħħlin fl-età) jew li jitwettqu l-kejliet fi stadji oħrajn tal-iżvilupp.

([b]) Huwa rakkomandat li l-frieħ ma jiġux ittestjati matul il-jumejn wara l-ftim (ara l-paragrafu 31). L-etajiet rakkomandati għall-ittestjar adoloxxenti huma: tagħlim u memorja = PND 25 ± 2; funzjoni motorja u sensorjali = PND 25 ± 2. Etajiet rakkomandati għall-ittestjar ta' żgħażagħ huma PND 60-70.

([c]) Il-piżijiet tal-ġisem għandhom jitkejlu tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa meta l-frieħ jiġu dożati direttament għall-aġġustament tad-doża fi żmien ta' żieda rapida fil-piż tal-ġisem.

([d]) Il-piżijiet tal-ġisem u n-newropatoloġija jistgħu jiġu vvalutati f'xi żmien li jiġi qabel (eż., PND 11), jekk xieraq (ara l-paragrafu 39).

([e]) Fażijiet oħrajn tal-iżvilupp minbarra l-piż tal-ġisem (eż., ftuħ tal-għajnejn) għandhom jiġu rreġistrati meta xieraq (ara l-paragrafu 31).

([f]) Ara l-paragrafu 35.

33. Il-ħrief ħajjin għandhom jingħaddu u jitqassmu skont is-sess eż., permezz ta' spezzjoni viżwali jew kejl tad-distanza anoġenitali (34)(35), u kull ferħ fi ħdan boton għandu jintiżen b'mod individwali fit-twelid jew ftit wara, tal-inqas darba fil-ġimgħa matul it-treddigħ, u tal-inqas darba kull ġimgħatejn wara. Meta tiġi evalwata l-maturità sesswali, l-età u l-piż tal-ġisem tal-annimal meta sseħħ patenza vaġinali (36) jew separazzjoni preputjali (37) għandhom jiġu ddeterminati għal tal-inqas annimal raġel wieħed u annimal mara wieħed għal kull boton.

▼M5

Ontoġenija tal-imġiba

34. L-ontoġenija tal-imġibiet magħżulin għandha titkejjel f'tal-inqas ferħ/sess/-boton wieħed matul il-perjodu tal-età xieraq, bl-istess frieħ li jintużaw fil-jiem kollha tat-test għall-imġibiet kollha vvalutati. Il-jiem tal-kejl għandhom jitqassmu b'mod regolari tul dak il-perjodu biex tiġi definita l-bidla normali jew dik relatata mal-kura fl-ontoġenija ta' dik l-imġiba (38). Dawn li ġejjin huma xi eżempji ta' mġibiet li tista' tiġi vvalutata l-ontoġenija tagħhom: rifless sabiex l-annimal iqum fuq saqajh, ġeotassi negattiva u attività motorja (38)(39)(40).

L-attività motorja

35. L-attività motorja għandha tiġi ssorveljata (41)(42)(43)(44)(45) matul il-perjodi ta' età ta' qabel il-ftim u tal-adultezza. Għall-ittestjar fil-ħin tal-ftim, ara l-paragrafu 32. Is-sessjoni tat-test għandha tkun twila biżżejjed biex tintwera drawwa bejn is-sessjonijiet għal kontrolli mhux ikkurati. L-użu tal-attività motorja biex tiġi vvalutata l-ontoġenija tal-imġiba huwa ferm rakkomandat. Jekk jintuża bħala test tal-ontoġenija tal-imġiba, f'dak il-każ l-ittestjar għandu juża l-istess annimali għas-sessjonijiet kollha tat-test ta' qabel il-ftim. L-ittestjar għandu jkun spiss biżżejjed biex tiġi vvalutata l-ontoġenija tad-drawwa fi ħdan is-sessjoni (44). Dan jista' jkun jeħtieġ tliet perjodi ta' żmien jew iktar qabel, u inkluż, il-jum tal-ftim (eż., PND 13, 17, 21). L-ittestjar tal-istess annimali, jew sħab tal-boton, għandu jseħħ f'età adulta qrib tmiem l-istudju (eż., PND 60-70). L-ittestjar f'jiem addizzjonali jista' jsir kif ikun hemm bżonn. L-attività motorja għandha tiġi ssorveljata permezz ta' apparat awtomatizzat li jrireġistra l-attività li għandu jkun kapaċi jidentifika kemm żidiet kif ukoll tnaqqisijiet fl-attività (jiġifieri attività bażi kif imkejla mill-istrument ma għandhiex tkun baxxa wisq tant li tipprekludi l-identifikazzjoni ta' tnaqqsijiet, u lanqas għolja wisq tant li tipprekludi l-qbid ta' żidiet fl-attività). Kull strument għandu jiġi ttestjat permezz ta' proċeduri standard biex tkun żgurata, kemm jista' jkun, l-affidabilità tal-operazzjoni bejn apparati u fost il-jiem. Kemm jista' jkun, il-gruppi tal-kura għandhom jiġu bbilanċjati bejn l-istrumenti. Kull annimal għandu jiġi ttestjat b'mod individwali. Il-gruppi tal-kura għandhom ikunu kontrobilanċjati bejn ħinijiet tat-test biex tiġi evitata konfużjoni permezz tar-ritmi ċirkadjani tal-attività. Għandhom isiru sforzi biex jiġi żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test huma minimi u mhumiex sistematikament relatati mal-kura. Fost il-varjabbli li jistgħu jaffettwaw afna miżuri tal-imġiba, inkluża l-attività motorja, hemm il-livell tal-ħoss, id-daqs u l-forma tal-gaġġa tat-test, it-temperatura, l-umdità relattiva, il-kundizzjonijiet tad-dawl, l-irwejjaħ, l-użu tal-gaġġa oriġinali jew gaġġa tat-test ġdida u distrazzjonijiet ambjentali.

Il-funzjoni motorja u sensorjali

36. Il-funzjoni motorja u sensorjali għandha tiġi analizzata f'dettall tal-inqas darba għall-perjodu adoloxxenti u darba matul il-perjodu taż-żgħożija (eż., PND 60-70). Għall-ittestjar fi żmien il-ftim, ara l-paragrafu 32. Għandu jsir ittestjar suffiċjenti biex jiġi żgurat kampjunar kwantitattiv adegwat tal-modalitajiet sensorjali (eż., somatosensorjali, vestibulari) u l-funzjonijiet motorji (eż.,saħħa, koordinazzjoni). Ftit eżempji ta' testijiet għall-funzjoni motorja u sensorjali huma rispons għal forza (46), rifless biex l-annimal iqum fuq saqajh (47)(48), drawwa ta' qatgħa awditorja (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54), u potenzjali evokati (55).

▼M5

Testijiet tat-tagħlim u tal-memorja

37. Għandu jsir test tat-tagħlim u l-memorja assoċjattivi wara l-ftim (eż.,, 25 ± 2 jum) u għal żgħażagħ (PND 60 u iktar). Għall-ittestjar fi żmien il-ftim, ara l-paragrafu 32. L-istess test(ijiet) jew oħrajn separati jistgħu jintużaw f'dawn iż-żewġ stadji tal-iżvilupp. Jista' jkun hemm xi flessibilità fl-għażla tat-test(ijiet) għat-tagħlim u l-memorja f'firien li jkunu għadhom kif infatmu u adulti. Madankollu, it-test(ijiet) għandhom jitfasslu b'tali mod li jissodisfaw żewġ kriterji. L-ewwel nett, it-tagħlim għandu jiġi vvalutat jew bħala bidla fuq bosta provi jew sessjonijiet ripetuti ta' tagħlim, jew, f'testijiet li jinvolvu prova waħda, b'referenza għal kundizzjoni li tivverifika hemmx effetti mhux assoċjattivi tal-esperjenza ta' taħriġ. It-tieni, it-test(ijiet) għandu jinkludi xi kejl tal-memorja (tat-terminu qasir jew fit-tul) minbarra t-tagħim oriġinali (kisba), iżda dan il-kejl tal-memorja ma jistax ikun irrapportat fin-nuqqas ta' miżura ta' kisba miksuba mill-istess test. Jekk it-test(ijiet) tat-tagħlim u l-memorja juri/u effett tas-sustanza kimika tat-test, jistgħu jiġu kkunsidrati testijiet addizzjonali biex jiġu evitati interpretazzjonijiet alternattivi bbażati fuq alterazzjonijiet fil-kapaċitajiet sensorjali, motivazzjonali u/jew motorji. Minbarra dawn iż-żewġ kriterji ta' hawn fuq, huwa rakkomandat li t-test tat-tagħlim u l-memorja jingħażel fuq il-bażi tas-sensittività murija tiegħu għall-klassi tas-sustanza kimika investigata, jekk it-tali informazzjoni tkun disponibbli fit-tagħrif. Fin-nuqqas ta' din l-informazzjoni, eżempji ta' testijiet li jistgħu jsiru biex jiġu ssodisfati -kriterji ta' hawn fuq jinkludu: evitar passiv (43)(56)(57), tlaqqigħ ittardjat mal-pożizzjoni għall-far adult (58) u għall-far tarbija (59), il-kundizzjonament olfattiv (43)(60), il-labirint fl-ilma ta' Morris (61)(62)(63), il-labirint ta' Biel jew Cincinnati (64)(65), il-labirint b'feħiet radjali (66), il-labirint T (43), u l-kisba u ż-żamma ta' mġiba kkontrollata minn skeda (26)(67)(68). Hemm testijiet addizzjonali deskritti fit-tagħrif dwar firien li jkunu għadhom kif infatmu (26)(27) u firien adulti (19)(20).

Awtopsja

38. L-annimali materni jistgħu jiġu ewtanizzati wara l-ftim tal-ulied.

39. L-evalwazzjoni newropatoloġika tal-ulied ser issir billi jintużaw tessuti minn annimali maqtulin b'mod dinjituż fil-PND 22 jew f'punt ta' żmien qabel bejn PND 11 u PND 22, kif ukoll fi tmiem l-istudju. Għal ulied maqtulin sal-PND 22, għandhom jiġu evalwati t-tessuti tal-moħħ; għal annimali maqtulin fit-tmiem, għandhom jiġu evalwati kemm it-tessuti tas-sistema nervuża ċentrali (CNS) kif ukoll it-tessuti tas-sistema nervuża periferali (PNS). L-annimali maqtulin fil-PND 22 jew qabel jistgħu jiġu fissati jew permezz ta' immersjoni jew perfużjoni. L-annimali maqtulin fi tmiem l-istudju għandhom jiġu fissati permezz ta' perfużjoni. L-aspetti kollha tat-tħejjija tal-kampjuni ta' tessut, mill-perfużjoni tal-annimali sad-dissezzjoni tal-kampjuni tat-tessuti, l-ipproċessar tat-tessuti, u t-tilwin tas-slides għadhom iħaddmu disinn kontrobilanċjat b'tali mod li kull lott ikun fih kampjuni rappreżentattivi minn kull grupp ta' doża. Tista' tinstab gwida addizzjonali dwar in-newropatoloġija fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru. 20(9), ara wkoll (103).

L-ipproċessar ta' kampjuni tat-tessuti

40. Għandha tittieħed nota tal-anormalitajiet grossi kollha li jidhru fi żmien in-nekropsija. Il-kampjuni tat-tessut meħudin għandhom jirrappreżentaw ir-reġjuni l-kbar kollha tas-sistema nervuża. Il-kampjuni tat-tessut għandhom jinżammu b'mod fissattiv xieraq u jiġu pproċessati skont protokolli standardizzati ppubblikati dwar l-istoloġija (69)(70)(71)(103). L-impjantazzjoni tal-paraffina hija aċċettabbli għal tessuti tas-CNS u l-PNS, iżda l-użu ta' ożmju wara l-fissazzjoni, flimkien ma' impjantazzjoni tal-eposside, jista' jkun

▼M5

xieraq meta jkun hemm bżonn ta' grad ogħla ta' riżoluzzjoni (eż.,għal nervi periferali meta tkun suspettata newropatija periferali u/jew anaiżi morfometrika tan-nervi periferali). It-tessut tal-moħħ miġbur għal analiżi morfometrika għandu jiġi impjantat fil-midjums xierqa fil-livelli tad-doża kollha fl-istess ħin sabiex jiġu evitati oġġetti li jiċkienu li jistgħu jkunu assoċjati ma' ħażna mtawla f'fissattiv (6).

Eżami newropatoloġiku

41. L-iskopijiet tal-eżami kwalitattiv huma:

(i) li jidentifika reġjuni fis-sistema nervuża li jesibixxu evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi;

(ii) li jidentifika tipi ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi li jirriżultaw minn esponiment għas-sustanza kimika tat-test; u

(iii) li jiddetermina l-medda tas-severità tal-alterazzjonijiet newropatoloġiċi.

It-taqsimiet istoloġiċi rappreżentattivi mill-kampjuni tat-tessut għandhom jiġu eżaminati bil-mikroskopju minn patoloġista mħarreġ kif xieraq għal evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi. L-alterazzjonijiet newropatoloġiċi kollha għandhom jiġu assenjati grad suġġettiv li jindika s-severità. Tilwin b'ematossilina u eosina jista' jkun biżżejjed biex jiġu evalwati taqsimiet tal-moħħ minn annimali maqtulin b'mod dinjituż fil-PND 22, jew qabel. Madankollu, tilwin tal-mjelin (eż.,, luxol fast blue/cresyl violet) u tilwin lewn il-fidda (eż., tilwin ta' Bielschowsky jew Bodians) huma rakkomandati għat-taqsimiet tat-tessuti tas-CNS u l-PNS minn annimali maqtulin fi tmiem l-istudju. Soġġetti għall-ġudizzju professjonali tal-patoloġista u t-tip ta' alterazzjonijiet osservati, tilwin ieħor jista' jitqies xieraq biex jiġu identifikati u kkaratterizzati tipi partikolari ta' alterazzjonijiet (eż., proteina aċidika fibrillari glijali (GFAP) jew istokimika tal-lektina biex jiġu vvalutati alterazzjonijiet glijali u mikroglijali (72), fluoro-jade biex tiġi identifikata nekrożi (73)(74), jew tilwin tal-fidda speċifiku għad-deġenerazzjoni newrali (75)).

42. Għandha ssir evalwazzjoni morfometrika (kwantitattiva) peress li din id-dejta tista' tgħin fl-identifikazzjoni ta' effett relatat mal-kura u hija utli fl-interpretazzjoni tad-differenzi relatati mal-kura fil-piż tal-moħħ jew il-morfoloġija (76)(77). It-tessut nervuż għandu jiġi kampjunat u jitħejja biex tkun tista' ssir evalwazzjoni morfometrika. L-evalwazzjonijiet morfometriċi jistgħu jinkludu eż., kejliet lineari jew areali ta' reġjuni speċifiċi tal-moħħ (78). Kejliet lineari jew areali jeħtieġu l-użu ta' taqsimiet omologi magħżulin bir-reqqa fuq il-bażi ta' punti referenzjarji mikroskopiċi affidabbli (6). Tista' tintuża l-istereoloġija biex jiġu identifikati effetti relatati mal-kura fuq parametri bħall-volum jew in-numru ta' ċelloli għal reġjuni newroanatomiċi speċifiċi (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. L-imħuħ għandhom jiġu eżaminati għal kwalunkwe evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi relatati mal-kura u għandhom jittieħdu kampjuni adegwati mir-reġjuni ewlenin kollha tal-moħħ (eż., il-basal olfattivi, il-kortiċi ċerebrali, l-ippokampu, il-gangliji tal-bażi, it-talamu, l-ipotalamu, il-meženċefalu (tektum, tegmentum, u pendunkuli ċerebrali), il-pont, il-medulla tawwalija, iċ-ċervellett) biex jiġi żgurat eżami dettaljat. Importanti li t-taqsimiet għall-annimali kollha jittieħdu fl-istess pjan. F'adulti maqtulin b'mod dinjituż fi tmiem l-istudju, għandhom jittieħdu kampjuni mit-taqsimiet rappreżentattivi tas-sinsla tad-dahar u l-PNS. Iż-żoni eżaminati għandhom jinkludu l-għajn bin-nerv ottiku u r-retina, is-sinsla tad-dahar fin-nefħiet ċervikali u lombari, il-fibri tal-għeruq dorsali u ventrali, in-nerv xjatiku prossimali, in-nerv tat-tibja prossimali (fl-irkoppa), u l-għeruq tal-muskolu tal-pexxul tan-nerv tat-tibja. It-taqsimiet tas-sinsla tad-dahar u tan-nerv periferali għandhom jinkludu kemm it-taqsimiet djagonali jew trasversali kif ukoll lonġitudinali.

▼M5

44. L-evalwazzjoni newropatoloġika għandha tinkludi eżami għal indikazzjonijiet ta' ħsara tal-iżvilupp fis-sistema nervaża (6)(85)(86)(87)(88)(89), minbarra l-alterazzjonijiet ċellolari (eż., vakwolazzjoni newronali, deġenerazzjoni, nekrożi) u bidliet fit-tessut (eż., glijożi, infiltrazzjoni lewkoċitika, formazzjoni ċistika). F'dan ir-rigward, importanti li l-effetti relatati mal-kura jiġu distinti minn avvenimenti normali tal-iżvilupp li jkunu magħrufin li jseħħu fi stadju tal-iżvilupp li jikkorrispondi għall-ħin tas-sagrifiċċju (90). L-eżempji ta' alterazzjonijiet sinifikanti li jindikaw ħsara tal-iżvilupp jinkludu, iżda mhumiex limitati għal:

— alterazzjonijiet fid-daqs jew il-forma gross tal-basal olfattivi, iċ-ċerebru jew iċ-ċervellett,

— alterazzjonijiet fid-daqs relattiv tal-bosta reġjuni tal-moħħ, inklużi tnaqqisijiet jew żidiet fid-daqs tar-reġjuni li jirriżultaw mit-telf jew il-persistenza ta' popolazzjonijiet normalment temporanji ta' ċelloli jew projezzjonijiet assonali (eż., saff ġerminali estern jew ċervellett, corpus callosum),

— alterazzjonijiet fil-proliferazzjoni, il-migrazzjoni, u d-differenzazzjoni, kif indikat miż-żoni ta' apoptożi jew nekrożi eċċessiva, għoqiedi jew popolazzjonijiet mifruxin ta' newroni ektopiċi, diżorjentati jew malformati jew alterazzjonijiet fid-daqs releattiv tal-bosta saffi ta' strutturi kortikali,

— alterazzjonijiet fil-mudelli ta' mjelinazzjoni, inkluż tnaqqis ġenerali fid-daqs jew tilwin alterat ta' strutturi mjelinati,

— evidenza ta' idroċefalu, b'mod partikolari tkabbir tal-ventrikli, stenożi tal-akwedott ċerebrali u tidjiq tal-emisferi ċerebrali.

Analiżi tar-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons tal-alterazzjonijiet newropatoloġiċi

45. Hija rakkomandata l-proċedura bbażata fuq passi li ġejja għall-analiżijiet newropatoloġiċi kwalitattivi u kwantitattivi. L-ewwel nett, it-taqsimiet mill-grupp ta' doża għolja huma mqabblin ma' dawk tal-grupp ta' kontroll. Jekk ma tinstab ebda evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi fl-annimali tal-grupp ta' doża għolja, ma jkun hemm bżonn ta' ebda analiżi ulterjuri. Jekk tinsab evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi fil-grupp ta' doża għolja, jiġu eżaminati l-annimali mill-gruppi ta' doża intermedja u baxxa. Jekk il-grupp ta' doża għolja jintemm minħabba mewt jew tossiċità oħra ta' konfużjoni, il-gruppi ta' doża għolja u intermedja għandhom jiġu analizzati għal alterazzjonijiet newropatoloġiċi. Jekk ikun hemm xi indikazzjoni ta' newrotossoċità fil-gruppi ta' doża baxxa, għandha ssir analiżi newropatoloġika f'dawk il-gruppi. Jekk tinstab xi alterazzjoni newropatoloġika relatata mal-kura fl-eżami kwalitattiv jew kwantitattiv, għandha tiġi ddeterminata d-dipendenza fuq id-doża tal-inċidenza, il-frekwenza u l-grad ta' severità tal-leżjonijiet jew tal-alterazzjonijiet morfometriċi, fuq il-bażi ta' evalwazzjoni tal-annimali kollha mill-gruppi ta' doża kollha. f'din l-evalwazzjoni għandhom ikunu inklużi r-reġjuni tal-moħħ li jesibixxu xi evidenza ta' alterazzjoni newropatoloġika għandhom ikunu inklużi. Ir-reġjuni kollha tal-moħħ li jesibixxu xi evidenza ta' alterazzjoni newropatoloġika għandhom Għal kull tip ta' leżjoni, għandhom jiġu deskritti l-karatteristiċi użati biex jiġi definit kull grad ta' severità, billi jiġu indikati l-karatteristiċi użati għad-differenzazzjoni ta' kull grad. Il-frekwenza ta' kull tip ta' leżjoni u l-grad ta' severità tagħha għandhom jiġu rreġistrati u għandha ssir analiżi statistika biex tiġi evalwata l-għamla ta' relazzjoni bejn id-doża u r-rispons. Huwa rakkomandat li jintużaw slides kodifikati (91).

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

46. Id-dejta għandha tiġi rrapportata b'mod individwali u tinġabar fil-qosor f'forma tabulari, li għal kull grupp tat-test turi t-tipi ta' bidla u n-numru ta' ommijiet, l-ulied skont is-sess, u l-boton li juru kull tip ta' bidla. Jekk ikun sar esponiment dirett tal-frieħ wara t-twelid, għandhom jiġu rrapportati r-rotta, id-durata u l-perjodu ta' esponiment.

▼M5

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

47. Studju dwar in-newrotossiċità tal-iżvilupp ser jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' esponiment ripetut għal sustanza kimika matul żvilupp *in utero* u kmieni wara t-twelid. Peress li jinxteħet enfasi kemm fuq punti aħħarin tat-tossiċità ġenerali kif ukoll tan-newrotossiċità tal-iżvilupp, ir-riżultati tal-istudju ser jippermettu li ssir distinzjoni bejn effetti tan-newrożvilupp li jseħħu fin-nuqqas ta' tossiċità materna, u dawk li jkunu espressi biss f'livelli li huma tossiċi wkoll għall-annimal matern. Minħabba l-interrelazzjonijiet kumplessi bejn id-disinn tal-istudji, l-analiżi statistika, u l-importanza bijoloġika tad-dejta, interpretazzjoni adegwata tad-dejta dwar in-newrotossiċità tal-iżvilupp ser tinvolvi ġudizzju tal-esperti (107)(109). L-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test għandha tuża approċċ ta' piż tal-evidenza (20)(92)(93)(94). Għandhom jiġu diskussi l-mudelli tas-sejbiet tal-imġiba jew morfoloġiċi, jekk ikunu preżenti, kif ukoll evidenza tar-rispons għad-doża. Dejta mill-istudji kollha rilevanti għall-evalwazzjoni tan-newrotossiċità tal-iżvilupp, inklużi studji jew rapporti ta' każijiet epidemjoloġiċi tal-bniedem, u studji sperimentali fuq annimali (eż., dejta tossikokinetika, informazzjoni struttura-attività, dejta minn studji oħrajn dwar it-tossiċità) għandha tkun inkluża f'din il-karatterizzazzjoni. Dan jinkludi r-relazzjoni bejn id-doża tas-sustanza kimika tat-test u l-preżenza jew in-nuqqas, l-inċidenza, u d-daqs ta' kwalunkwe effett newrotissiku għal kull sess (20)(95).

48. L-evalwazzjoni tad-dejta għandha tinkludi taħdita kemm fuq l-importanza bijoloġika kif ukoll dik statistika. L-analiżi statistika għandha titqies bħala għodda li tiggwida minflok tiddetermina l-interpretazzjoni tad-dejta. In-nuqqas ta' importanza statistika ma għandux ikun l-unika bażi għall-konklużjoni ta' nuqqas ta' effett relatat mal-kura, u lanqas mal-importanza statistika ma għandha tkun l-unika ġustifikazzjoni għall-konklużjoni ta' effett relatat mal-kura. Bħala protezzjoni kontra sejbiet negattivi foloz u d-diffikultajiet inerenti fil-"prova ta' negattiv", għandha tiġi diskussa dejta kontroll storiku u pożittiv disponibbli, speċjalment meta ma jkun hemm l-ebda effett relatat mal-kura (102)(106). Il-probabilità ta' pożittivi foloz għandha tiġi diskussa fid-dawl tal-evalwazzjoni statistika sħiħa tad-dejta (96). L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni, jekk ikun hemm waħda, bejn alterazzjonijiet newropatoloġiċi u tal-imġiba osservati.

49. Ir-riżultati kollha għandhom jiġu analizzati billi jintużaw mudelli statistiċi xierqa għad-disinn sperimentali (108). L-għażla ta' analiżi parametrika jew nonparametrika għandha tkun iġġustifikata billi jiġu kkunsidrati fatturi bħall-għamla tad-dejta (trasformata jew le) u d-distribuzzjoni tagħha, kif ukoll ir-robustezza relattiva tal-analiżi statistika magħżula. L-iskop u d-disinn tal-istudju għandhom jiggwida l-għażla tal-analiżijiet statistċi biex jiġu minimizzati żbalji tat-Tip I (pożittiv falz) u tat-Tip II (negattiv falz)(96)(97)(104)(105). L-istudji tal-iżvilupp li jużaw speċi li jwelldu ħafna frieħ u li fihom jiġu ttestjati diversi ħrief għal kull boton għandhom jinkludu l-boton fil-mudell statistiku bħala protezzjoni kontra rati ta' żball tat-Tip I imkabbrin (98)(99)(100)(101). L-unità statistika tal-kejl għandha tkun il-boton u mhux il-ferħ. L-esperimenti għandhom jitfasslu b'tali mod li l-aħwa tal-boton ma jitqisux osservazzjonijiet indipendenti. Kwalunkwe punt aħħari mkejjel b'mod ripetut fl-istess suġġett għandu jiġi analizzat billi jintużaw mudelli statistiċi li jieħdu f'kunsiderazzjoni n-nuqqas ta' dipendenza ta' dawk il-kejliet.

Rapport tat-test

50. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— in-natura fiżika u, fejn rilevanti, il-proprjetajiet fiżjokimiċi,

— dejta ta' identifikazzjoni, inkluż is-sors,

▼M5

— il-purità tal-preparazzjoni, u impuritajiet magħrufin u/jew antiċipati.

Veikolu (jekk xieraq):

— ġustifikazzjoni tal-għażla tal-veikolu, jekk mhuwiex ilma jew soluzzjoni salmastra fiżjoloġika.

Annimali tat-test:

— l-ispeċi u r-razza użati, u ġustifikazzjoni jekk ma jintużax far,

— il-fornitur tal-annimali tat-test,

— in-numru, l-età fil-bidu, u s-sess tal-annimali,

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija, id-dieta, l-ilma, eċċ.,

— il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-ħsieb wara l-għażla tal-livell ta' doża,

— il-ħsieb wara r-rotta tad-dożaġġ u l-perjodu ta' żmien,

— l-ispeċifikazzjonijiet tad-doża mogħtijin, inklużi d-dettalji tal-veikolu, il-volum u l-forma fiżika tal-materjal mogħti,

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/il-preparazzjoni tad-dieta, il-konċentrazzjoni, l-istabilità u l-omoġenità miksubin tal-preparazzjoni,

— il-metodu użat għall-identifikazzjoni unika tal-ommijiet u l-ulied,

— deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura/i aleatorja/i użata/i biex l-ommijiet jiġu assenjati għal gruppi tal-kura, biex jingħażlu l-frieħ għall-għażla, u biex il-frieħ jiġu assenjati għal gruppi tat-test,

— dettalji tal-għoti tas-sustanza kimika tat-test,

— konverżjoni minn konċentrazzjoni tad-dieta/ilma tax-xorb jew tas-sustanza kimika tat-test li tittieħed man-nifs (ppm) għad-doża propja (mg/kg piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli,

— il-kundizzjonijiet ambjentali,

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u l-ilma (eż., tat-tapp, distillat);

— id-dati ta' meta beda u spiċċa l-istudju.

Osservazzjonijiet u proċeduri tat-test:

— deskrizzjoni dettaljata tal-proċeduri użati biex l-osservazzjonijiet u l-proċeduri jiġu standardizzati kif ukoll definizzjonijiet operazzjonali għall-punteġġ tal-osservazzjonijiet;

— lista tal-proċeduri kollha tat-test użati, u ġustifikazzjoni għall-użu tagħhom;

— dettalji tal-proċeduri tal-imġiba/funzjonali, patoloġiċi, newrokimiċi jew elettrofiżjoloġiċi użati, inklużi informazzjoni u dettalji dwar strumenti awtomatizzati;

— proċeduri għall-kalibraġġ u l-iżgurar tal-ekwivalenza tal-istrumenti u l-ibbilanċjar tal-gruppi tal-kura fil-proċeduri tal-ittestjar;

— ġustifikazzjoni qasira li tispjega kwalunkwe deċiżjoni li tinvolvi ġudizzju professjonali.

▼**M5**

Riżultati (individwali u sommarju, inklużi l-medja u l-varjanza meta jkunu xierqa):

— in-numru ta' annimali fil-bidu tal-istudju u n-numru fi tmiem l-istudju,

— in-numru ta' annimali u boton użati għal kull metodu tat-test,

— in-numru ta' identifikazzjoni ta' kull annimal u l-boton li ġie minnu,

— id-daqs tal-boton u l-piż medju fil-bidu skont is-sess,

— dejta dwar il-piż tal-ġisem u dwar il-bidla fil-piż tal-ġisem, inkluż il-piż tal-ġisem terminali għall-ommijiet u l-ulied,

— dejta dwar il-konsum ta' ikel, u dejta dwar il-konsum ta' ilma jekk xierqa (eż., jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata permezz tal-ilma),

— dejta dwar ir-rispons tossiku skont is-sess u l-livell ta' doża, inklużi sinjali tat-tossiċità jew il-mortalità, inklużi l-ħin u l-kawża tal-mewt, jekk xieraq,

— in-natura, is-severità, id-durata, il-jum tal-bidu, il-ħin tal-ġurnata, u l-kors sussegwenti tal-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati,

— il-punteġġ f'kull fażi tal-iżvilupp (il-piż, il-maturità sesswali u l-ontoġenija tal-imġiba) f'kull ħin ta' osservazzjoni,

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha tal-imġiba, funzjonali, newropatoloġiċi, newrokimiċi, elettrofiżjoloġiċi skont is-sess, inklużi kemm żidiet kif ukoll tnaqqisiet minn kontrolli,

— sejbiet dwar in-nekropsija,

— piżijiet tal-ġisem,

— kwalunkwe dijanjosi msawra minn sinjali newroloġiċi u leżjonijiet, inklużi mard jew kundizzjonijiet li jseħħu b'mod naturali,

— stampi ta' sejbiet eżemplari,

— stampi b'enerġija baxxa biex tiġi vvalutata l-omoloġija tas-sezzjonijiet użati għall-morfometrija,

— dejta dwar l-assorbiment u l-metaboliżmu, inkluża dejta komplimentari minn studju tossikokinetiku separat, jekk disponibbli,

— it-trattament statistiku tar-riżultati, inklużi mudelli statistiċi użati biex tiġi analizzata d-dejta, u r-riżultati, irrilevanti jekk kinux sinifikanti jew le,

— lista tal-persunal tal-istudju, inkluż it-taħriġ professjonali.

Diskussjoni tar-riżultati:

— informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, skont is-sess u l-grupp,

— relazzjoni ta' kwalunkwe effett tossiku ieħor ma' konklużjoni dwar il-potenzjal newrotissiku tas-sustanza kimika tat-test, skont is-sess u l-grupp,

— l-impatt ta' kwalunkwe informazzjoni tossikokinetika fuq il-konklużjonijiet,

— is-similaritajiet tal-effetti ta' kwalunkwe newrotossiku magħruf,

▼M5

— dejta li ssostni l-affidabilità u s-sensittività tal-metodu tat-test (jiġifieri dejta ta' kontroll storiku u pożittiv),

— ir-relazzjonijiet, jekk jeżistu, bejn l-effetti newropatoloġiċi u funzjonali,

— l-NOAEL jew id-doża ta' riferiment għal ommijiet u ulied, skont is-sess u l-grupp.

Konklużjonijiet:

— diskussjoni dwar l-interpretazzjoni ġenerali tad-dejta bbażata fuq ir-riżultati, inkluża konklużjoni dwar jekk is-sustanza kimika tat-test ikkaġunatx newrotossiċità tal-iżvilupp u l-NOAEL.

TAGĦRIF

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Kopenħagen, id-Danimarka, 13-14 ta' Ġunju 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Disponibbli fuq: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Disponibbli fuq: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., Stati Uniti, 23-25 ta' Ottubru 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Pariġi. Lulju 2008. Disponibbli fuq: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage)
= en].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Pariġi, Settembru 2003. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼**M5**

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Il-Kapitolu B.34 ta' dan l-Anness, Studju dwar it-tossiċità riproduttiva ta' ġenerazzjoni waħda.

(15) Il-Kapitolu B.35 ta' dan l-Anness, Studju dwar it-tossiċità riproduttiva ta' żewġ ġenerazzjonijiet.

(16) Il-Kapitolu B.43 ta' dan l-Anness, Studju dwar in-Newrotossiċità fir-Rodituri.

(17) Il-Kapitolu B.31 ta' dan l-Anness, Studju dwar it-tossiċità tal-iżvilupp qabel it-twelid.

(18) Id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi. ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33.

(19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, Stati Uniti. Disponibbli fuq: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Ġinevra. Disponibbli fuq: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661-669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25-30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, Londra.

▼M5

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

▼**M5**

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21-27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288-325.

▼**M5**

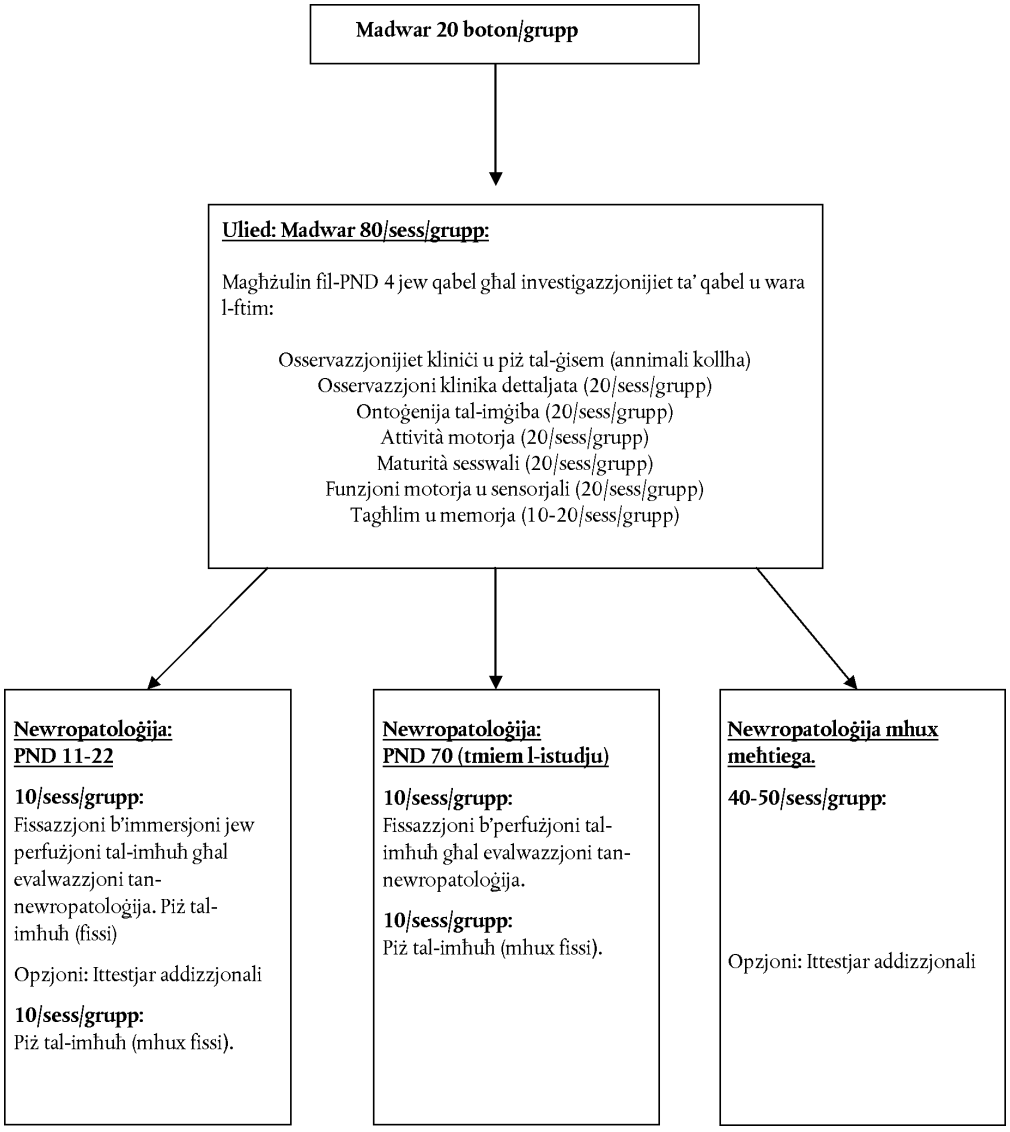
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

▼M5

Figura 1

Skema ġenerali ta' ttestjar għat-testijiet funzjonali/tal-imġiba, evalwazzjoni tan-newropatoloġija, u l-piżijiet tal-moħħ. Din id-dijagramma hija bbażata fuq id-deskrizzjoni fil-paragrafi 13-15 (PND = jum ta' wara t-twelid). L-eżempji tal-assenjament tal-annimali jingħataw fl-Appendiċi 1



▼M5

Appendiċi 1

1. Eżempji ta' assenjamenti possibbli huma deskritti u mdaħħlin fit-tabelli t'hawn taħt. Dawn l-eżempji huma pprovduti biex jintwera li l-assenjament tal-annimali tal-istudju għal bosta paradigmi ta' ttestjar jista' jsir b'numru ta' modi differenti.

L-Ewwel Eżempju

2. Sett wieħed ta' 20 ferħ/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jintuża għat-testijiet ta' qabel il-ftim tal-ontoġenija tal-imġiba. Minn dawn l-annimali, 10 ifrieħ/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jinqatlu b'mod dinjituż fil-PND 22. L-imħuħ jitneħħew, jintiżnu u jiġu pproċessati għal evalwazzjoni istopatoloġika. Barra minn hekk, tingabar dejta dwar il-piż tal-moħħ billi jintużaw imħuħ mill-10 irġiel u 10 nisa li jifdal għal kull livell ta' doża.

3. Sett ieħor ta' 20 annimal/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jintuża għat-testijiet funzjonali/tal-imġiba ta' wara l-ftim (osservazzjonijiet kliniċi dettaljati, attività motorja, qatgħa awtidotjra u ttestjar tal-funzjoni konjittiva fl-adoloxxenti) u valutazzjoni tal-età tal-maturità sesswali. Minn dawn l-annimali, 10 annimali/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton), jiġu anestetizzati u fissati permezz ta' perfużjoni fi tmiem l-istudju (madwar il-PND 70). Wara fissazzjoni addizzjonali in situ, il-moħħ jitneħħa u jiġi pproċessat għal evalwazzjoni newropatoloġika.

4. Għall-ittestjar tal-funzjoni konjittiva fiż-żgħażagħ (eż., PND 60-70), jintuża t-tielet sett ta' 20 ferħ/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton). Minn dawn l-annimali, 10 annimali/sess/grupp (raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jinqatlu fi tmiem l-istudju u l-moħħ jitneħħa u jintiżen.

5. L-20 annimal/sess/grupp li jifdal jitħallew għal testijiet addizzjonali possibbli.

Tabella 1

Nru tal-ferħ [a]		Numru ta' frieħ assenjati għat-test	Eżami/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontoġenija tal-imġiba
		10 m + 10 f	PND 22 piż tal-moħħ/newropatoloġija/morfometrija
		10 m + 10 f	PND 22 piż tal-moħħ
2	6	20 m + 20 f	Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati
		20 m + 20 f	Attività motorja
		20 m + 20 f	Maturità sesswali
		20 m + 20 f	Funzjoni motorja u sensorjali
		20 m + 20 f	Tagħlim u memorja (PND 25)
		10 m + 10 f	Piż tal-moħħ/newropatoloġija/morfometrija ta' annimali żgħażagħ ~PND 70

▼**M5**

Nru tal-ferħ [a]		Numru ta' frieħ assenjati għat-test	Eżami/Test
m	f		
3	7	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Tagħlim u memorja (żgħażagħ) Piż tal-moħħ ta' annimali żgħażagħ ~ PND 70
4	8	—	Annimali ta' riżerva għal sostituti jew testijiet addizzjonali

[a] Għal dan l-eżempju, il-boton jiġu separati u jitqassmu f'4 irġiel + 4 nisa; il-frieħ irġiel jingħataw in-numru 1 sa 4, il-frieħ nisa minn 5 sa 8.

Eżempju 2

6. Sett wieħed ta' 20 ferħ/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jintuża għall-ittestjar ta' qabel il-ftim tal-ontoġenija tal-imġiba. Minn dawn l-annimali, 10 frieħ/sess/livell ta' doża (raġel wieħed u mara waħda għal kull boton), jinqatlu b'mod dinjituż fil-PND 11. L-imħuħ jitneħħew, jintiżnu u jiġu pproċessati għal evalwazzjoni istopatoloġika.

7. Sett ieħor ta' 20 annimal/sess/livell ta' doża (raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jintuża għal eżamijiet ta' wara l-ftim (osservazzjonijiet kliniċi dettaljati, attività motorja, valutazzjoni tal-età ta' maturità sesswali u funzjoni motorja u sensorjali). Minn dawn l-annimali, 10 annimali/sess/-livell ta' doża (jiġifieriraġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jiġu anestetizzati u fissati permezz ta' perfużjoni fi tmiem l-istudju (madwar il-PND 70). Wara fissazzjoni addizzjonali *in situ*, il-moħħ jitneħħa, jintiżen u jiġi pproċessat għal evalwazzjoni newropatoloġika.

8. Għall-ittestjar tal-funzjoni konjittiva f'annimali adoloxxenti u żgħażagħ, 10 frieħ/sess/livell ta' doża jintużaw (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton). Jintużaw annimali differenti għall-ittestjar għal testijiet tal-funzjoni konjittiva fil-PND 23 u żgħażagħ. Fi tmiem l-istudju, l-10 annimali/sess/grupp ittestjati bħala adulti jinqatlu, il-moħħ jitneħħa u jintiżen.

9. L-20 annimal/sess/grupp li jifdal li ma jingħażlux għall-ittestjar u jiġu skartati fil-ftim.

Tabella 2

Nru tal-ferħ [a]		Nru ta' frieħ assenjati għat-test	Eżami/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Ontoġenija tal-imġiba PND 11 piż tal-moħħ/newropatoloġija/morfometrija
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati Attività motorja Maturità sesswali Funzjoni motorja u sensorjali Piż tal-moħħ/newropatoloġija/ morfometrija ta' annimali żgħażagħ ~PND 70

▼**M5**

Nru tal-ferħ [a]		Nru ta' frieħ assenjati għat-test	Eżami/Test
m	f		
3	7	10 m + 10 f [b]	Tagħlim u memorja (PND 23)
3	7	10 m + 10 f [b]	Tagħlim u memorja (żgħażagħ) Piż tal-moħħ ta' annimali żgħażagħ
4	8	—	Annimali maqtulin u skartati PND 21.

[a] Għal dan l-eżempju, il-boton jiġu separati u jitqassmu f'4 irġiel + 4 nisa; il-frieħ irġiel jingħataw in-numru 1 sa 4, il-frieħ nisa minn 5 sa 8.
[b] Il-frieħ differenti jintużaw għal testijiet konjittivi fil-PND 23 u f'annimali żgħażagħ (eż., boton żewġ/fard minn total ta' 20).

Eżempju 3

10. Sett wieħed ta' 20 ferħ/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jintuża għall-valutazzjoni tal-piż tal-moħħ u n-newropatoloġija fil-PND 11. Minn dawn l-annimali, 10 frieħ/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jinqatlu dinjituż fil-PND 11 u tneħħew, intiżnu u ġew ipproċessati 11-il moħħ għal evalwazzjoni istopatoloġika. Barra minn hekk, tingabar dejta dwar il-piż tal-moħħ billi jintużaw imħuħ mhux iffissati mill-10 annimali rġiel u nisa li jifdal għal kull livell ta' doża.

11. Sett ieħor ta' 20 annimal/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jintuża għall-ontoġenija tal-imġiba (attività motorja), eżamijiet ta' wara l-ftim (attività motorja u valutazzjoni tal-età tal-maturità sesswali), u ttestjar tal-funzjoni konjittiva fl-annimali adoloxxenti.

12. Sett ieħor ta' 20 annimal/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jintuża għal testijiet tal-funzjoni motorja u sensorjali (qatgħa awditorja) u osservazzjonijiet kliniċi dettaljati. Minn dawn l-annimali, 10 annimali/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wieħed jew mara waħda għal kull boton) jiġu anestetizzati u ffissati permezz ta' perfużjoni fi tmiem l-istudju (madwar il-PND 70). Wara l-fissazzjoni addizzjonali *in situ*, il-moħħ jitneħħa, jintiżen u jiġi pproċessat għal evalwazzjoni neweropatoloġika.

13. Sett ieħor ta' 20 ferħ/sess/livell ta' doża jintuża għall-ittestjar tal-funzjoni konjittiva f'annimali żgħażagħ (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton). Minn dawn, 10 annimali/sess/grupp (jiġifieri raġel wieħed u mara waħda għal kull boton) jinqatlu fi tmiem l-istudju, il-moħħ jitneħħa u jintiżen.

Tabella 3

Nru tal-ferħ [a]		Nru ta' frieħ assenjati għat-test	Eżami/Test
m	f		
1	5	10 m + 10 f	PND 11 piż tal-moħħ/newropatoloġija/morfometrija
		10 m + 10 f	PND 11 piż tal-moħħ
2	6	20 m + 20 f	Ontoġenija tal-imġiba (attività motorja)
		20 m + 20 f	Attività motorja
		20 m + 20 f	Maturità sesswali
		20 m + 20 f	Tagħlim u memorja (PND 27)

▼**M5**

Nru tal-ferħ [a]		Nru ta' frieħ assenjati għat-test	Eżami/Test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Qatgħa awditorja (adoloxxenti u żgħażagħ)
		20 m + 20 f	Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati
		10 m + 10 f	Piż tal-moħħ/newropatoloġija/ morfometrija ta' annimali żgħażagħ ~PND 70
4	8	20 m + 20 f	Tagħlim u memorja (annimali żgħażagħ)
		10 m + 10 f	Piż tal-moħħ ta' annimali żgħażagħ

[a] Għal dan l-eżempju, il-boton jiġu separati u jitqassmu f'4 irġiel + 4 nisa; il-frieħ irġiel jingħataw in-numru 1 sa 4, il-frieħ nisa minn 5 sa 8.

▼**M5**

Appendiċi 2

Definizzjonijiet:

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-metodu ta' ttestjar

▼M5

B.54. **BIJOASSAĠĠ UTEROTROFIKU F'RODITURI: TEST TA' TGĦARBIL TA' TERMINU QASIR GĦAL PROPRJETAJIET ESTROĠENIĊI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) tal-OECD Nru 440 (2007). L-OECD nediet attività ta' profil għoli fl-1998 sabiex jiġu riveduti l-linji gwida eżistenti u jiġu żviluppati linji gwida ġodda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' sustanzi potenzjali li jfixklu s-sistema endokrinali (1). Element minnhom tal-attività kien li tiżviluppa linja gwida tat-test għal Bijoassaġġ Uterotrofiku ta' rodituri. Imbagħad, il-Bijoassaġġ Uterotrofiku tar-rodituri għaddha minn programm estensiv ta' validazzjoni inkluża l-kompilazzjoni ta' dokument ta' sfond dettaljat (2)(3) u t-twettiq ta' studji estensivi fi ħdan u bejn laboratorji biex jintwerew ir-relevanza u r-riproduċibbiltà tal-bijoassaġġ b'estroġen ta' referenza potenti, agonisti riċetturi dgħajfin tal-estroġen, antagnist riċettur qawwi tal-estroġen, u sustanza kimika ta' referenza negattiva (4)(5)(6)(7)(8)(9). Dan il-metodu ta' ttestjar B.54 huwa r-riżultat tal-esperjenza miksuba matul il-programm tat-test ta' validazzjoni u r-riżultati miksubin fih b'agonisti estroġeniċi.

2. Il-Bijoassaġġ Uterotrofiku huwa test ta' tgħarbil b'terminu qasir li oriġina fis-snin tletin (27)(28) u ġie standardizzat għall-ewwel darba għat-tgħarbil minn kumitat tal-esperti fl-1962 (32)(35). Huwa msejjes fuq iż-żieda fil-piż uterin jew ir-rispons uterotrofiku (għal analiżi, ara 29). Jevalwa l-ħila ta' sustanza kimika sabiex tniedi attivitajiet bijoloġiċi konsistenti ma' agonisti jew antagonisti ta' estroġeni naturali (eż. 17ß-estradjol), madankollu, l-użu tagħha għall-identifikazzjoni ta' antagonist huwa ferm inqas komuni għall-agonisti. L-utru jirrispondi għal estroġeni b'żewġ modi. Rispons inizjali huwa żieda fil-piż minħabba imbibizzjoni ta' ilma. Dan ir-rispons huwa segwit minn żieda fil-piż minħabba tkabbir fit-tessut (30). Ir-risponsi tal-utri f'firien u ġrieden huma komparabbli b'mod kwalitattiv.

3. Dan il-bijoassaġġ iservi bħala assaġġ *in vivo* u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi li Jfixklu s-Sistema Endokrinali" (Appendiċi 2). F'dan il-Qafas Kunċettwali, il-Bijoassaġġ Uterotrofiku jinsab fil-Livell 3 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi dejta dwar mekkaniżmu endokrinali uniku, jiġifieri l-estroġeniċità.

4. Il-Bijoassaġġ Uterotrofiku huwa maħsub sabiex ikun inkluż f'sensiela ta' testijiet *in vitro* u *in vivo* biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi b'potenzjal li jinteraġixxu mas-sistema endokrinali, li finalment iwasslu għal valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħħa tal-bniedem jew l-ambjent. Il-programm ta' validazzjoni tal-OECD uża kemm agonisti b'saħħithom kif ukoll dgħajfin biex jevalwa l-prestazzjoni tal-assaġġ fl-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi (4)(5)(6)(7)(8). B'hekk, is-sensittività tal-proċedura tat-test għal agonisti tal-estroġen intweriet sew flimkien ma' riproduċibilità tajba intra u interlaboratorja.

5. Fir-rigward tal-kimiċi negattivi, fil-programm ta' valutazzjoni kienet inkluża biss sustanza kimika "negattiva" ta' referenza waħda li diġà kienet irrapportata negattiva minn assaġġ uterotrofiku kif ukoll tqabbad mar-riċettur *in vitro* u assaġġi ta' riċetturi, iżda ġiet evalwata dejta oħra dwar it-testijiet, mhux relatata mal-programm ta' validazzjoni tal-OECD, li kompliet issostni l-ispeċifiċità tal-Bijoassaġġ Uterotrofiku għat-tgħarbil ta' agonisti tal-estroġen (16).

▼**M5**

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

6. Agonisti u antagonisti tal-estroġen jaġixxu bħala ligandi għal riċetturi tal-estroġen α and β u jistgħu jattivaw jew jinibixxu, rispettivament, l-azzjoni transkrizzjonali tar-riċetturi. Dan jista' jkollu l-potenzjal li jwassal għal perikli tas-saħħa avversa, inkluži effetti fuq ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp. Għaldaqstant, hemm il-bżonn li sustanza kimika tiġi vvalutata u evalwata bħala agonista jew antagonista possibbli tal-estroġen. Filwaqt li informattiva, l-affinità ta' ligand għal riċettur tal-estroġen jew attivazzjoni transkrizzjonali ta' ġeni rapportaturi *in vitro* hija waħda mill-bosta determinanti ta' periklu possibbli. Determinanti oħrajn jistgħu jinkludu attivazzjoni u diżattivazzjoni metabolika malli jidħlu fil-ġisem, distribuzzjoni f'tessuti fil-mira, u tneħħija mill-ġisem, xi ħaġa li tal-inqas tiddependi b'mod parzjali fuq ir-rotta tal-amministrazzjoni u s-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Dan iwassal għall-bżonn li titgħarbel l-attività possibbli ta' sustanza kimika *in vivo* f'kundizzjonijiet rilevanti, sakemm il-karatteristiċi dwar is-sustanza kimika rigward l-Assorbiment — id-Distribuzzjoni — il-Metaboliżmu — l-Eliminazzjoni (ADME) ma jkunux diġà pprovdew l-informazzjoni xierqa. It-tessuti tal-utri jirrispondu bi tkabbir mgħaġġel u qawwi għall-istimolu mill-estroġeni, b'mod partikolari f'rodituri tal-laboratorju, li għandhom ċiklu estruż li jdum madwar 4 ijiem. Speċi ta' rodituri, b'mod partikolari l-firien, spiss jintużaw fi studji dwar it-tossiċità għal karatterizzazzjoni tal-periki. Għaldaqstant, l-utru tar-rodituri huwa organu mira xieraq għat-tgħarbil *in vivo* ta' agonisti u antagonisti tal-estroġen.

7. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq dawk il-protokolli mħaddmin fl-istudju ta' validazzjoni tal-OECD li ntwera li huwa affidabbli u ripetibbli fi studji intra u interlaboratorji (5)(7). Bħalissa, hemm żewġ metodi disponibbli, jiġifieri l-metodu tal-annimal mara adulta b'ovarettomija (metodu ovx-adult) u l-metodu tal-annimal mara immatura mingħajr ovarettomija (metodu immatur). Fil-programm tat-test ta' validazzjoni tal-OECD intwera li ż-żewġ metodi għandhom sensittività u riproduċibbiltà paragunabbli. Madankollu, l-immatur, peress li għandu assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG) intatt, huwa kemxejn inqas speċifiku iżda jkopri ambitu usa' ta' investigazzjoni mill-annimal ovarettomjat għaliex kapaċi jwieġeb għal sustanzi kimiċi li jinteraġixxu mal-assi HPG minflok ir-riċettur tal-estroġen biss. L-assi HGP tal-far huwa funzjonali fl-età ta' madwar 15-il jum. Qabel din, il-pubertà ma tistax titħaffef b'kuri bħal GnRH. Malli l-annimali nisa jibdew jilħqu l-pubertà, qabel il-ftuħ vaġinali, l-annimali nisa ser ikollhom ċikli silenzjuži li ma jirriżultawx fi ftuħ vaġinali jew ovulazzjoni, iżda hemm xi bidliet ormonali. Jekk sustanza kimika tistimola l-assi HPD b'mod dirett jew indirett, jirriżultaw pubertà prekoċi, ovluzzjoni bikrija u ftuħ vaġinali mħaffef. Mhux biss is-sustanzi kimiċi li jaġixxu fuq l-assi HPG jagħmlu dan iżda ċerti dieti b'livelli ogħla ta' enerġija metabolizzabbli minn oħrajn ser jistimolaw it-tkabbir u jħaffu l-ftuħ vaġinali bla ma jkunu estroġeniċi. It-tali sustanzi kimiċi ma jinduċux rispons uterotrofiku f'annimali adulti OVX peress li l-assi HPG tagħhom ma jaħdimx.

8. Għal raġunijiet ta' benessri tal-annimali, għandha tingħata preferenza lill-metodu billi jintużaw firien immaturi, billi tiġi evitata kura ta' qabel il-kirurġija tal-annimali u jiġi evitat nuqqas ta' użu possibbli ta' dawk l-annimali li jindikaw kwalunkwe evidenza ta' dħul fil-faži estruża (ara l-paragrafu 30).

▼**M5**

9. Ir-rispons uterotrofiku mhuwiex kompletament ta' oriġini estroġenika, jiġifieri sustanzi kimiċi li mhumiex agonisti jew antagonisti ta' estroġeni jistgħu jipprovdu rispons ukoll. Pereżempju, dożi relattivament għoljin ta' proġesteron, testosteron, jew diversi proġestini sintetiċi kollha jistgħu jwasslu għal rispons stimolattiv (30). Kwalunkwe rispons jista' jkun analizzat b'mod istoloġiku għal keratinizzazzjoni u kornifikazzjoni tal-vaġina (30). Tkun xi tkun l-oriġini possibbli tar-rispons, riżultat pożittiv ta' Bijoassaġġ Uterotrofiku normalment għandu jniedi azzjonijiet għal iktar kjarifika. Evidenza addizzjonali tal-estroġeniċità tista' tiġi minn assaġġi *in vitro*, bħall-assaġġi li jaqbdu mal-ER u assaġġi ta' attivazzjoni transkrizzjonali, jew minn assaġġi *in vivo* oħrajn bħall-assaġġ tal-pubertà tal-annimali nisa.

10. Peress li l-Bijoassaġġ Uterotrofiku jservi bħala assaġġ tat-tgħarbil *in vivo*, l-approċċ ta' validazzjoni meħud qeda kemm kunsiderazzjonijiet relatati mal-benessri tal-annimali kif ukoll strateġija ta' ttestjar b'saffi. Għal dan l-għan, sar sforz biex jiġu vvalidti b'mod rigoruż ir-riproduċibilità u s-sensittività għall-estroġeniċità — it-tħassib ewlieni għal ħafna susanzi kimiċi-, filwaqt li ftit li xejn sar sforz fir-rigward tal-komponent tal-antiestroġeniċità tal-assaġġ. Huwa biss antiestroġen wieħed b'attività b'saħħitha li ġie ttestjat peress li n-numru ta' sustanzi kimiċi bi profil antiestroġeniku ċar (mhux oskurat minn xi attività estroġenika) huwa ferm limitat. B'hekk, dan il-metodu ta' ttestjar huwa ddedikat għall-protokoll estroġeniku, filwaqt li l-protokoll li jiddeskrivi l-modalità antagonista tal-assaġġ huwa inkluż f'Dokument ta' Gwida (37). Ir-riproduċibilità u s-sensittività tal-assaġġ għas-sustanzi kimiċi b'attività purament antiestroġenika ser ikunu definiti b'mod iktar ċar iktar 'il quddiem, wara li l-proċedura tat-test tkun daħlet fir-rutina tal-użu għal ċertu żmien u jkunu ġew identifikati iktar sustanzi kimiċi b'din il-modalità ta' azzjoni.

11. Huwa rikonoxxut li l-proċeduri kollha bbażati fuq annimali ser jikkonformaw mal-istandards lokali tal-indukrar tal-annimali; id-deskrizzjonijiet tal-indukrar u l-kura stabbiliti hawn taħt huma standards minimi tal-prestazzjoni, u ser ikunu sostitwiti minn regolamenti lokali bħad-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (38). Gwida ulterjuri dwar it-trattament umanitarju tal-annimali tingħata mill-OECD (25).

12. Bħal bl-assaġġ kollha li jużaw annimali ħajjin, importanti li jkun żgurat li d-dejta hija verament neċessarja qabel ma jinbeda l-assaġġ. Pereżempju, żewġ kundizzjonijiet li fihom tista' tkun meħtieġa d-dejta huma:

— potenzjal għoli ta' esponiment (Livell 1 tal-Qafas Kunċettwali, Appendiċi 2) jew indikazzjonijiet għal estroġeniċità (Livell 2) biex jiġi investigat jekk it-tali effetti jistgħux iseħħu *in vivo*,

— effetti li jindikaw estroġeniċità f'testijiet *in vivo* tal-Livell 4 jew 5 biex ikun sostanzjat li l-effetti kienu relatati ma' mekkaniżmu estroġeniku li ma jistax jintwera permezz ta' test *in vitro*.

13. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

▼M5

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

14. Il-Bijoassaġġ Uterotrofiku jiddependi għas-sensittività tiegħu fuq sistema ta' ttestjar tal-annimali li fiha l-assi ipotalamiku-pitwitarju-ovarju mhuwiex funzjonali, xi ħaġa li twassal għal livelli endoġeni baxxi ta' estroġen li jiċċirkola. Dan ser jiżgura piż uterin bażi baxx u medda massima ta' rispons għal estroġeni amministrati. Żewġ stati sensittivi tal-estroġen fir-roditur mara jissodisfaw dan ir-rekwiżit:

(i) annimali nisa immaturi wara l-ftim u qabel il-pubertà, u

(ii) annimali nisa żgħażagħ wara ovarettomija b'ħin adegwat sabiex it-tessuti tal-utri jagħmlu rigress.

15. Is-sustanza kimika tat-test tingħata kuljum permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda. Dożi tas-sustanza kimika tat-test gradwati jingħataw lil minimu ta' żewġ gruppi tal-kura (ara l-paragrafu 33 għal gwida) ta' annimali sperimentali billi jintuża livell wieħed ta' doża għal kull grupp u perjodu ta' għoti ta' tliet ijiem konsekuttivi għal metodu immatur u perjodu ta' għoti minimu ta' tliet ijiem konsekuttivi għall-metodu adulti ovx. L-annimali huma nekropsjati madwar 24 siegħa wara l-aħħar doża. Għal agonisti tal-estroġen, il-piż uterin medju tal-gruppi ta' annimali kkurati fir-rigward tal-grupp veikolu huwa vvalutat għal żieda statistikament importanti. Żieda statistikament importanti fil-piż uterin medju ta' grupp tat-test tindika rispons pożittiv f'dan il-bijoassaġġ.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċi ta' annimali

16. Jistgħu jintużaw razez ta' rodituri tal-laboratorju użati spiss. Bħala eżempju, matul il-validazzjoni intużaw ir-razez Sprague-Dawley u Wistar ta' firien. Razez b'utri magħrufin jew suspettati li huma inqas risponsivi ma għandhomx jintużaw. Il-laboratorju għandu juri s-sensittività tar-razza użata kif deskritta fil-paragrafi 26 u 27.

17. Il-far u l-ġurdien intużaw spiss fil-Bijoassaġġ Uterotrofiku sa mis-snin tletin. L-istudji ta' validazzjoni tal-OECD saru biss b'firien fuq il-bażi ta' fehim li ż-żewġ speċi huma mistennija jkunu ekwivalenti u għalhekk, speċi waħda tkun biżżejjed għall-validazzjoni madwar id-dinja sabiex jiġu ffrankati riżorsi u annimali. Il-far huwa l-ispeċi tal-għażla f'ħafna mill-istudji dwar it-tossiċità riproduttiva u tal-iżvilupp. Peress li teżisti database storika vasta għal firien u, għalhekk, sabiex jitwessa' l-ambitu tal-metodu ta' ttestjar tal-Bijoassaġġ Utertrofiku f'rodituri għall-użu ta' ġrieden bħala speċi tat-test, sar studju limitat ta' validazzjoni ta' segwitu fil-ġrieden (16). Ingħażel approċċ komparattiv b'numru limitat ta' sustanzi kimiċi tat-test, laboratorji li jieħdu sehem u mingħajr ittestjar ta' kampjun kodifikat sabiex jinżamm l-iskop oriġinali biex jiġu ffrankati riżorsi u annimali. Dan l-istudju komparattiv ta' validazzjoni juri għall-Bijoassaġġ Uterotrofiku fi ġrieden ovarjettomizzati żgħażagħ li, b'mod kwalitattiv u kwantitattiv, id-dejta miksuba f'firien u ġrieden jikkorrispondi sew għal xulxin. Meta r-riżultat tal-Bijoassaġġ Uterotrofiku jista' jkun preliminari għal studju fit-tul, dan jippermetti sabiex fiż-żewġ studji jintużaw annimali mill-istess razza u sors. L-approċċ komparattiv kien limitat għall-ġrieden OVX u r-rapport ma jipprovdix dejta robusta stabbilita biex jiġi vvalidat il-mudell immatur, u b'hekk il-mudell immatur għall-ġrieden mhuwiex ikkunsidrat taħt il-kamp ta' applikazzjoni tal-metodu ta' ttestjar kurrenti.

▼M5

18. B'hekk, f'xi każijiet, jistgħu jintużaw ġrieden minflok firien. Għandha tingħata ġustifikazzjoni għal din l-ispeċi, fuq il-bażi ta' kriterji tossikoloġiċi, farmakokinetiċi u/jew oħrajn. Jista' jkun hemm bżonn ta' modifiki tal-protokoll għall-ġrieden. Pereżempju, il-konsum ta' ikel tal-ġrieden fuq bażi tal-piż tal-ġisem huwa ogħla minn dak tal-firien u, għaldaqstant, il-kontenut ta' fitoestroġen fl-ikel għandu jkun inqas għall-ġrieden milli għall-firien (9)(20)(22).

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-għalf

19. Il-proċeduri kollha għandhom jikkonformaw ma' standards lokali ta' indukrar tal-annimali tal-laboratorju. Dawn id-deskrizzjonijiet tal-indukrar u l-kura huma standards minimi u ser ikunu sostitwiti minn regolamenti lokali bħad-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (38). It-temperatura fil-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 °C (b'medda ta' madwar ± 3 °C). L-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas 30 % u idealment ma għandhiex taqbeż massimu ta' 70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra. Il-mira għandha tkun umdità relattiva ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali. Is-sekwenza tad-dawl ta' kuljum għandha tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam.

20. Id-dieta tal-laboratorju u l-ilma tax-xorb għandhom ikunu pprovduti *ad libitum*. L-annimali żgħażagħ jistgħu jitrabbew f'post b'mod individwali jew jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi li jaslu sa tliet annimali. Minħabba l-età żgħira tal-annimali immaturi, huwa rakkomandat li jitrabbew fi grupp soċjali.

21. Il-livelli għoljin ta' fitoestroġeni f'dieti tal-laboratorju huma magħrufin li jżidu l-piżijiet uterini fir-rodituri sa grad għolji biżżejjed li jxekkel il-Bijoassaġġ Uterotrofiku (13)(14)(15). Livelli għoljin ta' fitoestroġeni u ta' enerġija metabolizzabbli f'dieti tal-laboratorju jistgħu jirriżultaw f'pubertà bikrija wkoll, jekk jintużaw annimali immaturi. Il-preżenza ta' fitoestroġeni tirriżulta primarjament mill-inklużjoni ta' prodotti tas-sojja u tal-alfalfa fid-dieti tal-laboratorju u ntwera li konċentrazzjonijiet ta' fitoestroġeni jvarjaw minn lott għal ieħor ta' dieti standard tal-laboratorju (23). Il-piż tal-ġisem huwa varjabbli importanti, peress li l-kwantità ta' ikel ikkonsmat huwa relatat mal-piż tal-ġisem. Għalhekk, id-doża propja ta' fitoestroġen ikkonsmata mill-istess dieta tista' tvarja bejn speċi u skont l-età (9). Għal firien nisa immaturi, il-konsum tal-ikel fuq bażi ta' piż tal-ġisem jista' jkun bejn wieħed u ieħor id-doppju dak ta' firien adulti żgħażagħ b'ovarettomija. Għal ġrieden żgħażagħ, il-konsum tal-ikel fuq bażi tal-piż tal-ġisem jista' jkun bejn wieħed u ieħor erba' darbiet dak ta' firien żgħażagħ nisa b'ovarettomija.

22. Madankollu, ir-riżultati tal-Bijoassaġġ Uterotrofiku (9)(17)(18)(19) juru li kwantitajiet limitati ta' fitoestroġeni djetetiċi huma aċċettabbli u ma jnaqqsux is-sensittività tal-bijoassaġġ. Bħala gwida, livelli djetetiċi ta' fitoestroġeni ma għandhomx jaqbżu it-350 µg tal-ekwivalenti ta' genistein/gramma tad-dieta tal-laboratorju għal firien nisa immaturi Sprague Dawley u Wistar (6)(9). Dawn id-dieti għandhom ikunu xierqa wkoll meta jiġu ttestjati f'firien żgħażagħ b'ovarettomija għaliex il-konsum tal-ikel fuq bażi ta' piż tal-ġisem huwa inqas f'żgħażagħ meta mqabbel ma' annimali immaturi. Jekk ser jintużaw ġrieden adulti b'ovarettomija jew firien iktar sensittivi għal fitoestroġeni, għandu jiġi kkunsidrat tnaqqis proporzjonat fil-livelli tal-fitoestroġen fid-dieta (20). Barra minn hekk, id-differenzi f'enerġija metabolika disponibbli minn dieti differenti jistgħu jwasslu għal qabżiet fiż-żmien għall-bidu tal-pubertà (21)(22).

▼M5

23. Qabel l-istudju, hemm bżonn li ssir għażla bir-reqqa ta' dieta mingħajr livell għoli ta' fitoestroġeni (għal gwida ara (6)(9)) jew enerġija metabolizzabbli, li tista' tfixkel ir-riżultati (15)(17)(19)(22)(36). L-iżgurar tal-prestazzjoni xierqa tas-sistema tat-test użata mil-laboratorju kif speċifikat fil-paragrafi 26 u 27 huwa kontroll importanti fuq dawn iż-żewġ fatturi. Bħala salvagwardja konsistenti ma' prattika tajba tal-laboratorju (GLP) għandu jsir kampjunar rappreżentattiv ta' kull lott ta' dieta mogħtija matul l-istudju għal analiżi possibbli ta' kontenut fitoestroġenu (eż. fil-każ ta' piż ta' kontroll uterin għoli relatat ma' kontrolli storiċi jew rispons inadegwat għall-estroġen ta' referenza, 17 alfa etinil estradjol). L-alikwoti għandhom jiġu analizzati bħala parti mill-istudju jew jiġu ffriżati f'– 20 °C jew b'tali mod li jipprevjenu milli l-kampjun jiddekomponi qabel l-analiżi.

24. Ċerti materjali tas-sodod jista' jkun fihom sustanzi kimiċi estroġeniċi jew antiestroġeniċi li jseħħu b'mod naturali (eż. iċ-ċifċiegħa tal-qamħirrun hija magħrufa li taffettwa ċ-ċikliċità tal-firien u tidher li hija antiestroġenika). Il-materjal tas-sodda magħżul għandu jkun fih livell minimu ta' fitoestroġeni.

Preparazzjoni tal-annimali

25. Annimali sperimentali mingħajr evidenza ta' xi marda jew anormalità fiżika jingħażlu b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u tal-kura. Il-gaġeġ għandhom jiġu rranġati b'tali mod li jkunu minimizzati l-effetti possibbli dovuti għat-tqegħid tal-gaġġa. L-annimali għandhom jiġu identifikati b'mod uniku. Idealment, annimali immaturi għandhom jitqiegħdu f'gaġġa ma' ommijiet jew ommijiet adottivi sal-ftim matul l-akklimatizzazzjoni. Il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni qabel il-bidu tal-istudju għandu jkun ta' madwar 5 ijiem għal annimali żgħażagħ u għall-annimali immaturi ma' ommijiet jew ommijiet adottivi. Jekk l-annimali immaturi jinkisbu bħala annimali li għadhom kif infatmu mingħajr ommijiet, jista' jkun hemm bżonn ta' durata iqsar tal-perjodu ta' akklimatizzazzjoni peress li d-dożaġġ għandu jibda eżatt wara l-ftim (ara l-paragrafu 29).

PROĊEDURA

Verifika tal-Profiċjenza tal-Laboratorju

26. Jistgħu jintużaw żewġ għażliet differenti biex tiġi verifikata l-profiċjenza tal-laboratorju:

— Verifika perjodika, li tiddependi fuq studju bażi inizjali ta' kontroll pożittiv (ara l-paragrafu 27). Tal-inqas kull 6 xhur u kull darba li jkun hemm bidla li tista' tinfluwenza l-prestazzjoni tal-assaġġ (eż. formulazzjoni ġdida tad-dieta, bidla fil-persunal li jagħmel dissezzjonijiet, bidla fir-razza jew il-forniturі tal-annimali, eċċ), ir-risponsitività tas-sistema tat-test (mudell tal-annimal) għandha tiġi verifikata billi tintuża doża xierqa (fuq il-bażi tal-istudju bażi ta' kontroll pożittiv deskritt fil-paragrafu 27) ta' estroġen ta' referenza: 17α-etinil estradjol (Nru tas-CAS 57-63-6) (EE),

— L-użu ta' kontrolli konkurrenti, billi jiġi inkluż grupp mogħti doża xierqa ta' estroġen ta' referenza f'kull assaġġ.

Jekk is-sistema ma tweġibx kif mistenni, il-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu eżaminati u modifikati kif xieraq. Huwa rakkomandat li d-doża ta' estroġen ta' referenza tintuża f'wieħed mill-approċċi tkun ta' madwar ED70 sa 80.

▼M5

27. **Studju Bażi ta' Kontroll Pożittiv** — Qabel ma laboratorju jwettaq studju b'dan il-metodu ta' ttestjar għall-ewwel darba, il-profiċjenza tal-laboratorju għandha tintwera billi tiġi ttestjata r-risponsività tal-mudell tal-annimal, billi jiġi stabbilit ir-rispons tad-doża ta' estroġen ta' referenza: 17α-etinil estradjol (Nru tas-CAS 57-63-6) (EE) b'minimu ta' erba' dożi. Ir-rispons tal-piż uterin ser jitqabbel ma' dejta storika stabbilita (ara r-referenza (5)). Jekk dan l-istudju bażi ta' kontroll pożittiv ma jrendix ir-riżultati antiċipati, il-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu eżaminati u modifikati.

In-numru u l-kundizzjoni tal-annimali

28. Kull grupp ikkurat u ta' kontroll għandu jkun fih tal-inqas 6 annimali (kemm għall-protokoll tal-metodu immatur kif ukoll dak tal-adulti ovx).

L-età tal-annimali immaturi

29. Għall-Bijoassaġġ Uterotrofiku b'annimali immaturi, irid ikun speċifikat il-jum tat-twelid. Id-dożaġġ għandu jibda kmieni biżżejjed sabiex jiġi żgurat li, fi tmiem l-għoti tas-sustanza kimika tat-test, tkun għadha ma seħħitx iż-żieda fiżjoloġika tal-estroġeni endoġenużi assoċjata mal-pubertà. Min-naħa l-oħra, hemm evidenza li annimali żgħar ħafna jistgħu jkunu inqas sensittivi. Għad-definizzjoni tal-età ottimali, kull laboratorju għandu jieħu f'kunsiderazzjoni d-dejta ta' sfond tiegħu stess fuq il-maturità.

Bħala gwida ġenerali, id-dożaġġ fil-firien jista' jibda minnufih wara l-ftim bikri fil-jum 18 ta' wara t-twelid (bil-jum tat-twelid li jkun il-jum 0 ta' wara t-twelid). Idealment, id-dożaġġ fil-firien għandu jitlesta fil-jum 21 ta' wara t-twelid iżda dejjem qabel il-jum 25 ta' wara twelid għax, wara din l-età, l-assi ipotalamiku-pitwitarju-ovarju jsir funzjonali u l-livelli ta' estroġen endoġenu jistgħu jibdew jiżdiedu b'żieda konkomitanti fil-medji tal-piż uterin bażi u żieda fid-devjazzjonijiet standard tal-grupp (2)(3)(10)(11)(12).

Proċedura għal ovarettomija

30. Għall-far u l-ġurdien mara b'ovarettomija (gruppi ta' trattament u kontroll), l-ovarettomija għandha ssir fl-età ta' bejn 6 u 8 ġimgħat. Għall-firien, għandhom ikunu għaddew tal-inqas 14-il jum bejn l-ovarettomija u l-ewwel jum ta' għoti sabiex l-utri jkun jista' jagħmel rigress għal linja bażi stabbli minima. Għall-ġrieden, għandhom jgħaddu tal-inqas 7 ijiem bejn l-ovarettomija u l-ewwel jum ta' għoti. Peress li ammonti żgħar ta' tessut tal-ovarji huma biżżejjed biex jiġu prodotti livelli ċirkolanti sinifikanti ta' estroġeni (3), l-annimali għandhom jiġu ttestjati qabel l-użu billi jiġu osservati ċelloli epiteljali kampjunati bit-tajjar mill-vaġina f'tal-inqas ħamest ijiem konsekuttivi (eż., il-jiem 10-14 wara l-ovarettomija għall-firien). Jekk l-annimali jindikaw xi evidenza ta' dħul fil-perjodu estruż, l-annimali ma għandhomx jintużaw. Barra minn hekk, fin-nekropsija, il-kampjuni tal-ovarji għandhom jiġu eżaminati għal xi evidenza tal-preżenza tat-tessut tal-ovarji. Jekk iva, l-annimal ma għandux jintuża fil-kalkoli (3).

31. Il-proċedura tal-ovarettomija tibda bl-annimal fir-rikombenza ventrali wara li l-annimal jiġi anestetizzat kif xieraq. Il-qasma li tiftaħ il-ħajt tal-addome dorsolaterali għandha tkun ta' madwar 1 cm u parallela fil-punt nofsani bejn il-limitu inferjuri kostali u l-qoxra iljaka, u ftit millimetri laterali mill-marġni laterali tal-muskolu lombari. L-ovarju għandu jinqala' fejn jiltaqgħu l-kanal salovarju u l-korp uterin. Wara l-konferma li ma jkun hemm ebda fsad qawwi, il-ħajt tal-addome għandu jingħalaq bil-ħjata u l-ġilda għandha tingħalaq permezz ta' autoclips jew ħjata xierqa. Il-punti tal-lega jintwerew b'mod skematiku fil-Figura 1. Għandha tintuża analġeżija xierqa ta' wara l-operazzjoni kif rakkomandat minn veterinarju b'esperjenza fl-indukrar ta' rodituri.

▼M5

Piż tal-ġisem

32. Fil-metodu tal-adulti ovx, il-piż tal-ġisem u l-piż uterin mhumiex korrelatati għaliex il-piż uterin huwa affettwat minn ormoni bħal estroġeni iżda mhux mill-fatturi ta' tkabbir li jirregolaw id-daqs tal-ġisem. Min-naħa l-oħra, il-piż tal-ġisem huwa relatat mal-piż uterin fil-mudell immatur, waqt li jkun qed jimmatura (34). B'hekk, fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati, fil-mudell immatur, għandha tkun minima u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju. Dan ifisser li d-daqs tal-boton għandu jkun standardizzat minn min jgħammar, biex jiġi żgurat li l-ulied ta' annimali minn ommijiet differenti ser jitgħalfu bejn wieħed u ieħor l-istess. L-annimali għandhom jiġu assenjati fi gruppi (kemm kontroll kif ukoll kura) permezz ta' distribuzzjoni tal-piż aleatorja, sabiex il-piż medju tal-ġisem ta' kull grupp ma jkunx statistikament differenti minn kwalunkwe grupp ieħor. Għandha tingħata kunsiderazzjoni biex jiġi evitat l-assenjament ta' sħab boton fl-istess grupp tal-kura sa fejn dan ikun prattikabbli bla ma jiżdied in-numru ta' boton li għandhom jintużaw għall-investigazzjoni.

Dożaġġ

33. Sabiex jiġi stabbilit jekk sustanza kimika tat-test jistax ikollha azzjoni estroġenika *in vivo*, żewġ gruppi ta' doża u kontroll normalment ikunu biżżejjed u għalhekk, dan il-metodu huwa ppreferut għal raġunijiet marbuta mal-benessri tal-annimali. Jekk l-iskop huwa li jew tinkiseb kurva ta' rispons għad-doża jew li ssir estrapolazzjoni għal dożi inqas, hemm bżonn ta' tal-inqas 3 gruppi ta' doża. Jekk ikun hemm bżonn ta' informazzjoni minbarra l-identifikazzjoni ta' attività estroġenika (bħal stima tal-potenza), għandha tiġi kkunsidrata skeda differenti tad-dożaġġ. Ħlief għall-kura bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu fl-għoti tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-istess ammont ta' veikolu użat mal-gruppi kkurati (jew l-ogħla volum użat mal-gruppi tat-test jekk ikun differenti bejn il-gruppi).

34. F'dan il-każ, l-għan tal-Bijoassaġġ Uterotrofiku huwa li jingħażlu dożi li jiżguraw sopravvivenza tal-annimali u li huma mingħajr tossiċità sinifikanti jew diffikultà għall-annimali wara tliet ijiem konsekuttivi ta' għoti tas-sustanza kimika sa doża massima ta' 1 000 mg/kg/jum. Il-livelli kollha ta' doża għandhom jiġu proposti u jingħażlu filwaqt li tittieħed f'kunsiderazzjoni kwalunkwe dejta (tossiko) kinetika u dwar it-tossiċità eżistenti disponibbli għas-sustanza kimika tat-test jew materjali relatati. L-ogħla livell ta' doża għandu l-ewwel nett jieħu f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni dwar l-LD50 u/jew it-tossiċità akuta sabiex jiġu evitati mewt, tbatija severa jew diffikultà fl-annimali (24)(25)(26). L-ogħla doża għandha tirrappreżenta d-doża massima tollerata (MTD); studju li jsir f'livell tad-doża li kkaġuna rispons uterotrofiku pożittiv tkun aċċettata wkoll. Għat-tgħarbil, intervalli kbar (eż. unitajiet ta' nofs log li jikkorrispondu għal progressjoni tad-doża ta' 3,2 jew anki sa unitajiet ta' log waħda) bejn dożaġġi ġeneralment huma aċċettabbli. Jekk ma jkun hemm ebda dejta xierqa disponibbli, jista' jitwettaq studju ta' sejbien tal-medda biex jgħin fid-determinazzjoni tad-dożi li għandhom jintużaw.

35. Inkella, jekk il-potenza estroġenika ta' agonist tista' tiġi stmata permezz ta' dejta *in vitro* (jew *in silico*), din tista' tiġi kkunsidrata għall-għażla tad-doża. Pereżempju, l-ammont tas-sustanza kimika tat-test li tipproduċi risponsi uterotrofiċi ekwivalenti għall-agonist ta' referenza (etinil estradjol) huwa stmat mill-potenzi *in vitro* relattivi tiegħu għal etinil estradjol. L-ogħla doża tat-test tingħata permezz ta' moltiplikazzjoni ta' din id-doża ekwivalenti b'fattur xieraq, eż. 10 jew 100.

▼M5

Kunsiderazzjonijiet għas-sejbien tal-medda

36. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jsir studju preliminari ta' sejbien tal-medda bi ftit annimali. F'dan ir-rigward, id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 19 (25) jista' jintuża biex jiġu definiti s-sinjali kliniċi li jindikaw tossiċità jew diffikultà tal-annimali. Jekk fattibbli fi ħdan dan l-istudju ta' sejbien tal-medda wara tliet ijiem ta' għoti, l-utri jistgħu jinqatgħu u jintiżnu madwar 24 wara l-aħħar doża. Imbagħad din id-dejta tkun tista' tintuża biex tassisti fid-disinn tal-istudju ewlieni (agħżel dożi massimi u inferjuri aċċettabbli u rrakkomanda n-numru ta' gruppi tad-doża).

L-għoti ta' dożi

37. Is-sustanza kimika tat-test tingħata permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda. Iridu jitqiesu kunsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali kif ukoll aspetti tossikoloġiċi bħar-relevanza għar-rotta ta' esponiment tal-bniedem għas-sustanza kimika (eż. gavage orali biex tiġi simulata inġestjoni, tilqima taħt il-ġilda biex jiġi simulat teħid man-nifs jew adsorbiment dermali), il-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi tal-materjal tat-test u speċjalment informazzjoni tossikoloġika eżistenti u dejta dwar il-metaboliżmu u l-kinetika (eż. il-bżonn li jiġi evitat metaboliżmu first pass, effiċjenza aħjar b'rotta partikolari) meta tingħażel ir-rotta tal-amministrazzjoni.

38. Huwa rakkomandat li, fejn ikun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni milwiema. Iżda peress li ħafna mil-liganti tal-oestroġenu jew il-prekursuri metaboliċi tagħhom għandhom it-tendenza li jkunu odrofobiċi, l-iktar approċċ komuni huwa li tintuża soluzzjoni/sospensjoni fiżżejt (eż. żejt tal-qamħirrun, tal-karawett, tal-ġunġlien jew taż-żebbuġa). Madankollu, dawn iż-żjut għandhom kontenut kaloriku u ta' xaħam differenti, u b'hekk il-veikolu jista' jaffettwa l-konsum ta' enerġija metabolizzabbli (ME) totali, u b'hekk potenzjalment jibdel il-punti aħħarin imkejlin bħall-piż uterin, speċjalment fil-metodu immatur (33). B'hekk, qabel l-istudju, kwalunkwe veikolu li għandu jintuża għandu jiġi ttestjat fl-isfond tal-kontrolli bla veikoli. Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinħallu f'ammont minimu ta' 95 % etanol jew solventi xierqa oħrajn u dilwiti għall-konċentrazzjonijiet tal-ħidma finali fil-veikolu tat-test. Il-karatteristiċi tossiċi tas-solvent iridu jkunu magħrufin, u għandhom jiġu ttestjati fi grupp ta' kontroll separat bis-solventi biss. Jekk is-sustanza kimika tat-test titqies stabbli, tista' tintuża azzjoni mekkanika ġentili vigoruża u tat-tisħin biex tassisti fil-ħall tas-sustanza kimika tat-test. Għandha tiġi ddeterminata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu. Jekk is-sustanza kimika tat-test tkun stabbli għad-durata tal-istudju, jista' jitħejja alikwot tal-bidu tas-sustanza kimika, u d-dilwizzjonijiet tad-dożaġġ speċifikati jitħejjew kuljum.

39. Il-puntwalità tad-dożaġġ ser tiddependi mill-mudell użat (irreferi għall-paragrafu 29 għall-mudell immatur u għall-paragrafu 30 għall-mudell adulti ovx). Il-firien nisa immaturi jingħataw doża bis-sustanza kimika tat-test kuljum għal tliet ijiem konsekuttivi. Hija rakkomandata wkoll kura ta' tliet ijiem għal firien nisa b'ovarettomija iżda esponimenti itwal huma aċċettabbli u jistgħu jtejbu l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi attivi dgħajfin. Fil-ġrieden nisa b'ovarettomija, durata tal-applikazzjoni ta' 3 ijiem għandha tkun biżżejjed mingħajr vantaġġ importanti permezz ta' estensjoni li tasal sa sebat ijiem għal agonisti b'saħħithom tal-estroġen, madankollu, din ir-relazzjoni ma ntwerietx għal estroġeni dgħajfin fl-istudju ta' validazzjoni (16) u b'hekk id-dożaġġ għandu jkun estiż sa sebat ijiem konsekuttivi fi ġrieden adulti ovx. Id-doża għandha tingħata bosta drabi kuljum. Għandhom ikunu aġġustati kif ikun hemm bżonn biex jinżamm livell kostanti tad-doża f'termini ta' piż tal-ġisem tal-annimal (eż., mg tas-sustanza kimika tat-test għal kull kg ta' piż tal-ġisem kuljum). Rigward il-volum tat-test, il-varjabbiltà tiegħu, fuq baži ta' piż tal-ġisem, għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ta' dożaġġ biex jiġi żgurat volum kostanti fuq baži ta' piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża u għal kwalunkwe rotta tal-amministrazzjoni.

▼M5

40. Meta s-sustanza kimika tat-test tingħata b'gavage, dan għandu jsir b'doża waħda ta' kuljum lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Għandhom jiġu segwiti l-linji gwida lokali dwar l-indukrar tal-annimali, iżda l-volum ma għandux jaqbeż il-5 ml/kg piż tal-ġisem, ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża 10 ml/kg piż tal-ġisem.

41. Meta s-sustanza kimika tat-test tingħata permezz ta' tilqima taħt il-ġilda, dan għandu jsir b'doża waħda ta' kuljum. Id-dożi għandhom jingħataw fir-reġjuni dososkapulari jew lombari permezz ta' labra sterili (eż. wisgħa ta' 23 jew 25) u siringa tuberkulina. It-tqaxxir tas-sit tat-tilqima huwa fakultattiv. Għandhom jiġu rreġistrati kwalunkwe telf, tnixxija fis-sit tat-tilqima jew dożaġġ inkomplut. Il-volum totali injettat f'kull far f'ġurnata ma għandux jaqbeż il-5 ml/kg piż tal-ġisem, maqsum f'2 sti tat-tilqima, ħlief fil-każ ta' soluzzjoni milwiema fejn jista' jintuża 10 ml/kg piż tal-ġisem.

Osservazzjonijiet

Osservazzjonijiet ġenerali u kliniċi

42. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali tal-inqas darba kuljum u b'mod iktar spiss meta jkunu osservati sinjali ta' tossiċità. Idealment, l-osservazzjonijiet għandhom isiru fl-istess ħin(ijiet) ta' kull ġurnata u fil-waqt li jitqies il-perjodu tal-ogħla effetti antiċipati wara d-dożaġġ. L-annimali kollha għandhom jiġu osservati għall-mortalità, il-morbidità u sinjali kliniċi ġenerali bħal bidlet fl-imġiba, il-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukuża, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u l-attività awtonomika (eż. dmugħ, piloerezzjoni, daqs tal-ħabba, mudell respiratorju mhux tas-soltu).

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel

43. L-annimali kollha għandhom jintiżnu għall-eqreb 0,1 g, billi jibdew ftit qabel il-bidu tal-kura, jiġifieri meta l-annimali jiġu allokati fi gruppi. Bħala kejl fakultattiv, l-ammont ta' ikel ikkonsmat matul il-perjodu tal-kura jista' jitkejjel għal kull gaġġa billi jintiżnu dawk li jitgħalfu. Ir-riżultati tal-konsum ta' ikel għandhom jingħataw fi grammi għal kull far kuljum.

Dissezzjoni u kejl tal-piż tal-utru

44. Erbgħa u għoxrin siegħa wara l-aħħar kura, il-firien ser jinqatlu b'mod dinjituż. Idealment, l-ordni ta' nekropsija ser tkun aleatorja fost gruppi biex tiġi evitata progressjoni direttament 'il fuq jew 'l isfel ta' gruppi ta' doża li tista' taffettwa d-dejta b'mod li jkun diffiċli jinqabad. L-għan tal-bijoassaġġ huwa li jitkejjel kemm il-piż tal-utru mxarrab kif ukoll dak niexef. Il-piż imxarrab jinkludu l-utru u l-kontenuti tal-fluwidu luminali. Il-piż niexef huwa mkejjel wara li jitbattlu u jitneħħew il-kontenuti luminali tal-utru.

45. Qabel id-dissezzjoni, il-vaġina tiġi eżaminata għal-istatus tal-ftuħ fl-annimali immaturi. Il-proċedura ta' dissezzjoni tibda billi jinfetaħ il-ħajt tal-addome li jibda fis-simfiżi pubika. Imbagħad, il-qarn tal-utru u l-ovarji, jekk ikunu preżenti, jinqalgħu mill-ħajt tal-addome dorsali. L-appart tal-urina u l-uretri jitneħħew min-naħa ventrali u laterali tal-utru u l-vaġina. Adeżjoni fibruża bejn ir-rektum u l-vaġina tinqala' sakemm ikun jista' jiġi identifikat fejn jiltaqgħu l-orifiċju vaġinali u l-ġilda perineali. L-utru u l-vaġina jinqalgħu mill-ġisem billi ssir inċiżjoni fil-ħajt vaġinali ftit 'il fuq mill-għaqda bejn il-ġilda perineali kif muri fil-Figura 2. L-utru għandu jinqala' mill-ħajt tal-ġisem permezz ta' qatgħa ġentili tal-meżenterija uterina fil-punt tat-tqabbid tagħha fit-tul sħiħ tal-lat dorsolaterali ta' kull qarn uterin. Ladarba jitneħħa

▼M5

mill-ġisem, it-tqandil tal-uterin għandu jkun rapidu biżżejjed biex tiġi evitata desikkazzjoni tat-tessuti. It-telf ta' piż minħabba desikkazzjoni jsir iktar importanti b'tessuti żgħar bħall-utru (23). Jekk l-ovarji jkunu preżenti, l-ovarji jitneħħew fil-kanal salovarju biex jiġi evitat telf ta' fluwidu luminali mill-qarn uterin. Jekk l-annimal tkun saritlu ovarettomija, il-qtajja' għandhom jiġu eżaminati għall-preżenza ta' xi tessut tal-ovarji. Xaħam u tessut konnettiv żejda għandhom jinqatgħu. Il-vaġina titneħħa mill-utru ftit taħt iċ-ċerviċi sabiex iċ-ċerviċi jibqa' mal-korp uterin kif muri fil-Figura 2.

46. Kull utru għandu jiġi ttrasferit f'kontenitur immarkat b'mod uniku u li jintiżen (eż. petri-dish jew plastic weight boat) filwaqt li jitkompla l-indukrar biex tiġi evitata desikkazzjoni qabel jintiżen (eż. karta xuga ftit imxarrba b'salmastru tista' titqiegħed fil-kontenitur). L-utru bi fluwidu luminali ser jintiżen sal-eqreb 0,1 mg (piż tal-utru mxarrab).

47. Imbagħad kull utru jiġi pproċessat b'mod individwali biex jitneħħa l-fluwidu luminali. Iż-żewġ qrun tal-utru ser jittaqqbu jew jinqatgħu b'mod lonġitudinali. L-utru jitqiegħed fuq karta xuga ftit imxarrba (eż. Whatman Nru 3) u tintmesaħ ftit b'biċċa oħra ta' karta xuga ftit imxarrba biex il-fluwidu luminali jitneħħa għal kollox. L-utru mingħajr il-kontenuti luminali ser jintiżen sal-eqreb 0,1 mg (piż tal-utru niexef).

48. Il-piż tal-utru fit-tmiem jista' jintuża biex jiġi żgurat li ma nqabżitx l-età xierqa fil-far intatt immatur, madankollu, id-dejta storika tar-razza tal-far użata mil-laboratorju hija deċiżiva f'dan ir-rigward (ara l-paragrafu 56 għal interpretazzjoni tar-riżultati).

Investigazzjonijiet fakultattivi

49. Wara li jintiżen, l-utru jista' jiġi ffissat f'formalin b'bafer newtrali ta' 10 % biex jiġi eżaminat b'mod istopatoloġiku wara tilwim b'Ematossilina u Osina (HE). Il-vaġina tista' tiġi studjata kif xieraq (ara l-paragrafu 9). Barra minn hekk, il-kejl morfometriku tal-epitelju endometrijali jista' jsir għal tqabbil kwantitattiv.

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

50. Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

— in-numru ta' annimali fil-bidu tal-assaġġ,

— in-numru u l-identità tal-annimali misjubin mejtin matul l-assaġġ jew maqtulin għal raġunijiet umanitarji u d-data u l-ħin ta' kwalunkwe mewta jew qatla b'mod dinjituż,

— in-numru u l-identità tal-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, u deskrizzjoni tas-sinjali tat-tossiċità osservata, inkluż il-ħin tal-bidu, id-durata, is-severità ta' kwalunkwe effett tossiku, u

— in-numru u l-identità tal-annimali li juru kwalunkwe leżjoni u deskrizzjoni tat-tip ta' leżjonijiet.

▼**M5**

51. Dejta individwali dwar l-annimali għandha tiġi rreġistrata għall-piżijiet tal-ġisem, il-piż uterin imxarrab, u l-piż uterin niexef. Għandha tintuża analiżi statistika one-tailed għall-agonisti biex jiġi ddeterminat jekk l-għoti ta' sustanza kimika tat-test irriżultatx f'żieda statistikament importanti ($p < 0,05$) fil-piż uterin. Analiżijiet statistiċi xierqa għandha ssir biex isiru testijiet għal bidliet relatati mal-kura fil-piż uterin niexef u mxarrab. Pereżempju, id-dejta tista' tiġi evalwata permezz ta' analiżi tal-approċċ ta' kovarjanza (ANCOVA) bil-piż tal-ġisem fin-nekropsija bħall-kovarjabbli. Tista' ssir trasformazzjoni logaritmika li tistabbilizza l-varjanza fuq id-dejta uterina qabel ma ssir l-analiżi tad-dejta. It-testijiet Dunnett u Hsu huma xierqa biex isir tqabbil ta' pari ta' kull grupp mogħti doża ma' kontrolli veikolu u biex jiġu kkalkolati l-intervalli ta' kunfidenza. Jistgħu jintużaw plots residwi studentizzati biex jinqabdu punti ta' osservazzjoni distanti possibbli għall-valutazzjoni tal-omoġenità tal-varjanzi. Dawn il-proċeduri ġew applikati fil-programm ta' validazzjoni tal-OECD bl-użu tal-PROC GLM fis-Sistema ta' Analiżi Statistika (l-Istitut SAS, Cary, NC), verżjoni 8 (6)(7).

52. Rapport finali għandu jinkludi:

Faċilità ta' ttestjar:

— Il-persunal responsabbli u r-responsabilitajiet tal-istudju tiegħu,

— Dejta mit-Test Bażi ta' Kontroll Pożittiv u dejta perjodika ta' kontroll pożittiv (ara l-paragrafi 26 u 27),

Sustanza kimika tat-test:

— Il-karatterizzazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test,

— L-għamla fiżika u, fejn rilevanti, il-proprjetajiet fiżjokimiċi,

— Il-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet,

— Kwalunkwe dejta ġġenerata fuq l-istabbiltà,

— Kwalunkwe analiżi tas-soluzzjonijiet ta' dożaġġ,

Veikolu:

— Il-karatterizzazzjoni tal-veikolu tat-test (għamla, fornitur u lott),

— Ġustifikazzjoni tal-għażla tal-veikolu (jekk mhux ilma),

Annimali tat-test:

— L-ispeċi u r-razza u ġustifikazzjoni tal-għażla tagħhom,

— Il-fornitur u l-faċilità speċifika tal-fornitur,

— L-età mal-provvista bid-data tat-twelid,

— Jekk l-annimali huma immaturi, jekk ġewx forniti mal-omm jew omm adottiva u d-data tal-ftim,

— Dettalji dwar il-proċedura ta' akklimatizzazzjoni tal-annimali,

— In-numru ta' annimali għal kull gaġġa,

— Dettalji u l-metodu ta' identifikazzjoni tal-annimal individwali u tal-grupp,

Kundizzjonijiet tal-Assaġġ:

— Dettalji dwar il-proċess tal-każwalizzazzjoni (jiġifieri l-metodu użat),

— Ir-raġuni għall-għażla tad-doża,

▼M5

— Dettalji dwar il-fomulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, il-konċentrazzjonijiet, l-istabbiltà u l-omoġenità tagħha,

— Dettalji tal-għoti tas-sustanza kimika tat-test u r-raġuni għall-għażla tar-rotta ta' esponiment,

— Id-dieta (isem, tip, fornitur, kontenut, u, jekk ikunu magħrufin, il-livelli tal-fitoestroġen),

— Is-sors ta' ilma (eż., ilma tal-vit jew ilma ffiltrat) u l-provvista tal-ilma (b'tubi minn kontenitur kbir, fi fliexken, eċċ.),

— Il-bejta (l-isem, it-tip, il-fornitur, il-kontenut),

— Reġistru tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, l-intervall tad-dawl, it-temperatura u l-umdità fil-kamra, it-tindif tal-kamra,

— Deskrizzjoni dettaljata tan-nekropsija u tal-proċeduri ta' wżin tal-utri

— Deskrizzjoni tal-proċeduri statistiċi,

Riżultati

Għal annimali individwali:

— Il-piżijiet tal-ġisem individwali kollha ta' kuljum (mill-allokazzjoni fi gruppi san-nekropsija) (sal-eqreb 0,1 g),

— L-età ta' kull annimal (fil-jiem li jibdew mill-jum tat-twelid bħala l-jum 0) meta jibda l-għoti tas-sustanza kimika tat-test,

— Id-data u l-ħin ta' kull għoti ta' doża,

— Il-volum u d-dożaġġ ikkalkolati mogħtijin u l-osservazzjonijiet ta' kwalunkwe telf ta' dożaġġ matul jew wara l-għoti,

— Reġistru ta' kuljum tal-qagħda tal-annimal, inklużi sintomi u osservazzjonijiet rilevanti,

— Il-kawża tal-mewt issuspettata (jekk tinsab matul studju fi stat moribond jew mejjet),

— Id-data u l-ħin tal-qti b'mod dinjituż b'intervall tal-ħin għall-aħħar dożaġġ,

— Il-piż uterin imxarrab (sal-eqreb 0,1 mg) u kwalunkwe osservazzjoni ta' telf ta' fluwidu luminali matul id-dissezzjoni u l-preparazzjoni biex jintiżen,

— Piż uterin niexef (sal-eqreb 0,1 mg),

Għal kull grupp ta' annimali:

— Il-piżijiet medji tal-ġisem ta' kuljum (sal-eqreb 0,1 g) u devjazzjonijiet standard (minn allokazzjoni fi gruppi permezz ta' nekropsija),

— Medji tal-piżijiet uterini mxarrbin u nixfin (sal-eqreb 0,1 mg) u devjazzjonijiet standard,

— Jekk jitkejjel, il-konsum ta' ikel ta' kuljum (ikkalkolat bħala grammi ta' ikel ikkonsmat għal kull annimal),

▼M5

— Ir-riżultati tal-analiżijiet statistiċi li jqabblu kemm piżijiet uterini mxarrbin kif ukoll nixfin ta' gruppi kkurati fir-rigward tal-istess kejliet fil-gruppi ta' kontroll veikoli,

— Ir-riżultati tal-analiżi statistika li tqabbel il-piż sħiħ tal-ġisem u ż-żieda fil-piż tal-ġisem tal-gruppi kkurati relatati mal-istess kejliet fil-gruppi ta' kontroll veikoli.

53. Sommarju tal-fatti importanti ta' gwida tal-metodu ta' ttestjar

	Firien	Ġrieden
Annimali		
Razza	Razza ta' rodituri tal-laboratorju użata spiss	
Numru ta' annimali	Tal-inqas 6 annimali għal kull grupp ta' doża	
Numru ta' gruppi	Tal-inqas 2 gruppi tat-test (ara l-paragrafu 33 għal gwida) u grupp ta' kontroll negattiv Għal gwida dwar gruppi ta' kontroll pożittiv, ara l-paragrafi 26 u 27	
Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-għalf		
T° fil-kamra tal-annimali	22°C ± 3°C	
Umdità relativa	50-60 % u mhux inqas minn 30 % jew iktar minn 70 %	
Sekwenza tad-dawl ta' kuljum	12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam	
Dieta u ilma tajjeb għax-xorb	Ad libitum	
Post tat-trobbija	B'mod individwali jew fi gruppi sa tliet annimali (trobbija fi grupp soċjali hija rakkomandata għal annimali immaturi)	
Dieta u bejta	Livell baxx ta' fitoestroġeni rakkomandati fid-dieta u l-bejta	
Protokoll		
Metodu	Metodu immatur mingħajr ovarjettomija (dak preferut). Metodu ta' firien nisa adulti b'ovarettomija	Metodu ta' ġrieden nisa adulti b'ovarettomija
L-età tad-dożaġġ għal annimali immaturi	Mhux qabel PND 18. Id-dożaġġ għandu jsir qabel PND 25	Mhux rilevanti fil-kamp ta' applikazzjoni tal-metodu ta' ttestjar attwali.
Età tal-ovarettomija	Età ta' bejn 6 u 8 ġimgħat.	
Età tad-dożaġġ għal annimali b'ovarettomija	Għandhom ikunu għaddew tal-inqas 14-il jum bejn l-ovarettomija u l-1 jum ta' għoti.	Għandhom ikunu għaddew tal-inqas 7 ijiem bejn l-ovarettomija u l-1 jum ta' għoti.
Piż tal-ġisem	Il-varjazzjoni fil-piż tal-ġisem għandha tkun minima u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju.	

▼M5

	Firien	Ġrieden
Dożaġġ		
Rotta tal-amministrazzjoni	Gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda	
Frekwenza tal-għoti	Doża waħda kuljum	
Ammont ta' volum għal gavage u tilqima	≤ 5 ml/kg piż tal-ġisem (jew sa 10 ml/kg piż tal-ġisem f'każ ta' soluzzjonijiet milwiema) (f'2 siti ta' tilqim għar-rotta taħt il-ġilda)	
Durata tal-għoti	3 ijiem konsekuttivi għall-mudell immatur Tal-inqas 3 ijiem konsekuttivi għall-mudell OVX	7 ijiem konsekuttivi għall-mudell OVX
Ħin tan-nekropsija	Madwar 24 siegħa wara l-aħħar doża	
Riżultati		
Rispons pożittiv	Żieda statistikament sinifikanti tal-piż medju tal-utru (imxarrab u/jew niexef)	
Estroġen ta' referenza	17α-etinil estradjol	

GWIDA GĦALL-INTERPRETAZZJONI U L-AĊĊETTAZZJONI TAR-RIŻULTATI

54. B'mod ġenerali, test għall-estroġeniċità għandu jitqies pożittiv jekk ikun hemm żieda statistikament importanti fil-piż tal-utru ($p < 0,05$) tal-inqas fil-livell għoli tad-doża meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll b'solvent. Riżultat pożittiv huwa appoġġjat iktar mill-wiri ta' relazzjoni bijoloġikament plawżibbli bejn id-doża u d-daqs tar-rispons, filwaqt li jitfakkar li attivitajiet estroġeniċi u antiestroġeniċi tas-sustanza kimika li jidħlu f'xulxin jistgħu jaffettwaw il-forma tal-kurva bejn id-doża u r-rispons.

55. Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma tinqabiżx id-doża massima tollerata ħalli tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Tnaqqis fil-piż tal-ġisem, sinjali kliniċi u sejbiet oħrajn għandhom jiġu vvalutati fid-dettall f'dan ir-rigward.

56. Kunsiderazzjoni importanti għall-aċċettazzjoni tad-dejta mill-Bijoassaġġ Uterotrofiku hija l-piżijiet tal-utru tal-grupp ta' kontroll veikolu. Valuri ta' kontroll għoljin jitsgħu jikkompromettu r-risponsitività tal-bijoassaġġ u l-ħila li jiġu identifikati agonisti tal-estroġen ferm dgħajfin. Analiżijiet tat-tagħrif u d-dejta ġġenerata matul il-validazzjoni tal-Bijoassaġġ Uterotrofiku jissuġġerixxu li waqtiet ta' medji ta' kontroll għoljin iseħħu b'mod spontanju, b'mod partikolari f'annimali immaturi (2)(3)(6)(9). Peress li l-piż tal-utru ta' firien immaturi jiddependi fuq bosta varjabbli bħar-razza u l-piż tal-ġisem, ma jista' jingħata ebda limitu superjuri definittiv għall-piż tal-utru. Bħala gwida, jekk il-piżijiet tal-utru niexef f'firien ta' kontroll immaturi jkunu ta' bejn 40 u 45 mg, ir-riżultati għandhom jitqiesu bħala suspettużi u piżijiet tal-utri ta' iktar minn 45 mg jistgħu jwasslu sabiex it-test jerġa' jsir. Madankollu, dan irid jitqies fuq bażi ta' każ b'każ (3)(6)(8). Meta jsiru testijiet f'firien adulti, ovarettomija inkompluta ser tħalli tessut tal-ovarji li jista' jipproduċi estroġenu endoġenu u jittardja r-rigressjoni tal-piż tal-utru.

▼M5

57. Piżijiet tal-utru niexef tal-kontroll veikolu li huma inqas minn 0,09 % tal-piż tal-ġiesm għal firien nisa immaturi u inqas minn 0,04 % għal firien nisa żgħażagħ b'ovarettomija jidhru li jrendu riżultati aċċettabbli (ara t-Tabella 31 (2)). Jekk il-piżijiet tal-utru tal-kontroll ikunu ikbar minn dawn in-numru, għandhom jiġu skrutinizzati bosta fatturi inklużi l-età tal-annimali, ovarettomija xierqa, fitoestroġeni djetetiċi, u l-bqija, u riżultat ta' assaġġ negattiv (ebda indikazzjoni ta' attività estroġenika) għandu jintuża bir-reqqa.

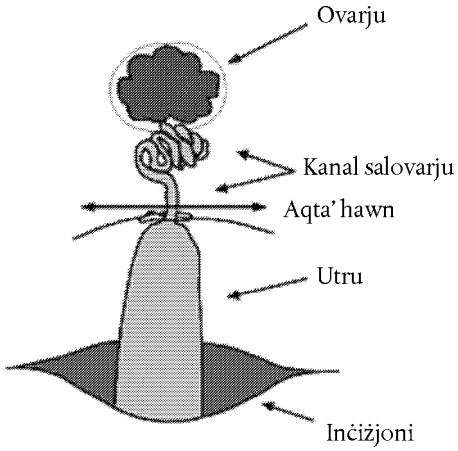
58. Dejta storika għall-gruppi ta' kontroll veikolu għandha tinżamm fil-laboratorju. Dejta storika għal risponsi għal estroġeni ta' referenza pożittivi, bħal 17α-etinil estradjol, għandha tinżamm fil-laboratorju wkoll. Il-laboratorji jistgħu jittestjaw ukoll ir-rispons għal agonisti tal-estroġen dgħajfin li jkunu magħrufni. Din id-dejta kollha tista' titqabbel mad-dejta disponibbli (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) biex jiġi żgurat li l-metodi tal-laboratorju jrendu biżżejjed sensittività.

59. Il-piżijiet tal-utru niexef urew inqas varjabbiltà matul l-istudju ta' validazzjoni tal-OECD meta mqabblin mal-piżijiet tal-utru mxarrab (6)(7). Madankollu, rispons importanti f'xi kejl jindika li s-sustanza kimika tat-test hija pożittiva għal attività estroġenika.

60. Ir-rispons uterotrofiku mhuwiex kompletament ta' oriġini estroġenika, madankollu, riżultat pożittiv tal-Bijoassaġġ Uterotrofiku għandu ġeneralment jiġi interpretat bħala evidenza għal potenzjal estroġeniku in vivo, u normalment għandu jniedi azzjonijiet għal klassifikazzjoni ulterjuri (ara l-paragrafu 9 u l-'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals', Anness 2).

Figura 1

Dijagramma skematika turi t-tħennija kirurġika tal-ovarji



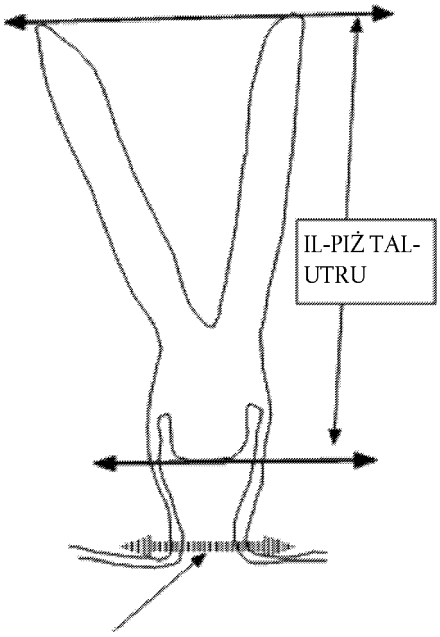
Il-mesometrju, il-vaskulatura u l-massa tax-xaħam ma jidhrux

Il-proċedura tibda billi jinfetaħ il-ħajt tal-addome dorsolaterali fil-punt tan-nofs bejn il-limitu inferjuri kostali u l-qoxra iljaka, u ftit millimetri laterali għall-marġni laterali tal-muskolu lombari. Fi ħdan il-kavità tal-addome, għandhom jiġu identifikati l-ovarji. Fuq pjan asettiku, imbagħad l-ovarji jitneħħew fiżikament mill-kavità tal-addome, titqiegħed ligatura bejn l-ovarju u l-utru biex jiġi kkontrollat il-fsad, u l-ovarju jinqala' permezz ta' inċiżjoni fuq il-ligatura fl-għaqda tal-kanal salovarju u kull qarn tal-utru. Wara l-konferma li ebda fsad importanti ma għadu jippersisti, il-ħajt tal-addome għandu jingħalaq b'sutura, u tingħalaq il-ġilda, eż., b'autoclips jew sutura. L-annimali għandhom jitħallew jirkupraw u l-piż tal-utru għandu jitħalla jagħmel rigress għal tal-inqas 14-il jum wara l-użu.

▼**M5**

Figura 2

It-tneħħija u l-preparazzjoni tat-tessuti tal-utru għall-kejl tal-piż



Il-linja ta' diskonnessjoni fl-awtopsja

Il-proċedura tibda billi jinfetaħ il-ħajt tal-addome fis-simfiżi pubika. Imbagħad, kull ovarju, jekk ikun preżenti, u l-qarn tal-utru jitneħħew mill-ħajt tal-addome dorsali. L-apparat tal-urina u l-uretri jitneħħew mil-lat ventrali u laterali tal-utru u l-vaġina. L-adeżjoni fibruża bejn ir-rektum u l-vaġina jinqalgħu sakemm l-għaqda tal-orifiċju vaġinali u l-ġilda perineali jkunu jistgħu jiġu identifikati. L-utru u l-vaġina jinqalgħu mill-ġisem permezz ta' inċiżjoni tal-ħajt vaġinali ftit 'il fuq mill-għaqda bejn il-ġilda perineali kif muri fil-figura. L-utru għandu jinqala' mill-ħajt tal-ġisem billi ssir qatgħa ħafifa tal-meżenterija uterina fil-punt ma' fejn taqbad matul it-tul sħiħ tal-aspett dorsolaterali ta' kull qarn uterin. Wara t-tneħħija mill-ġisem, ix-xaħam żejjed u t-tessut konnettiv jinqata'. Jekk ikunu preżenti l-ovarji, l-ovarji jitneħħew fil-kanal salovarju biex jiġi evitat telf ta' fluwidu luminali mill-qarn uterin. Jekk l-annimal tkun saritlu ovarettomija, il-qtajja' għandhom jiġu eżaminati għal-preżenza ta' xi tessut tal-ovarji. Il-vaġina titneħħa mill-utru eżatt taħt iċ-ċerviċi sabiex iċ-ċerviċi jibqa' mal-korp uterin kif muri fil-figura. Imbagħad l-utru jista' jintiżen.

▼**M5**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET:

Antiestroġeniċità hija l-kapaċità ta' sustanza kimika sabiex trażżan l-azzjoni tal-estradjol 17ß f'organiżmu mammiferu.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Data tat-twelid hija l-jum 0 wara t-twelid.

Dożaġġ hija terminu ġenerali li tinvolvi d-doża, il-frekwenza tagħha u d-durata tad-dożaġġ.

Doża hija l-ammont ta' sustanza kimika mogħtija. Għall-Bijoassaġġ Uterotrofiku, id-doża tingħata bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull piż tal-ġisem ta' unità tal-annimal tat-test f'kull jum (eż. mg/kg piż tal-ġisem/jum).

Doża Massima Tollerabbli (MTD) hija l-ogħla ammont ta' sustanza kimika li, meta tiddaħħal fil-ġisem, ma toqtolx lill-annimali tat-test (denotata b'LD_0) (IUPAC, 1993).

Estroġeniċità hija l-kapaċità li sustanza kimika taġixxi bħal estradjol 17ß f'organiżmu mammiferu.

Jum X wara t-twelid huwa l-jum numru X tal-ħajja wara t-twelid.

Sensitività hija l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar.

Speċifiċità hija l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Uterotrofika hija terminu użata biex tiġi deskritta influwenza pożittiva fuq it-tkabbir tat-tessuti tal-utru.

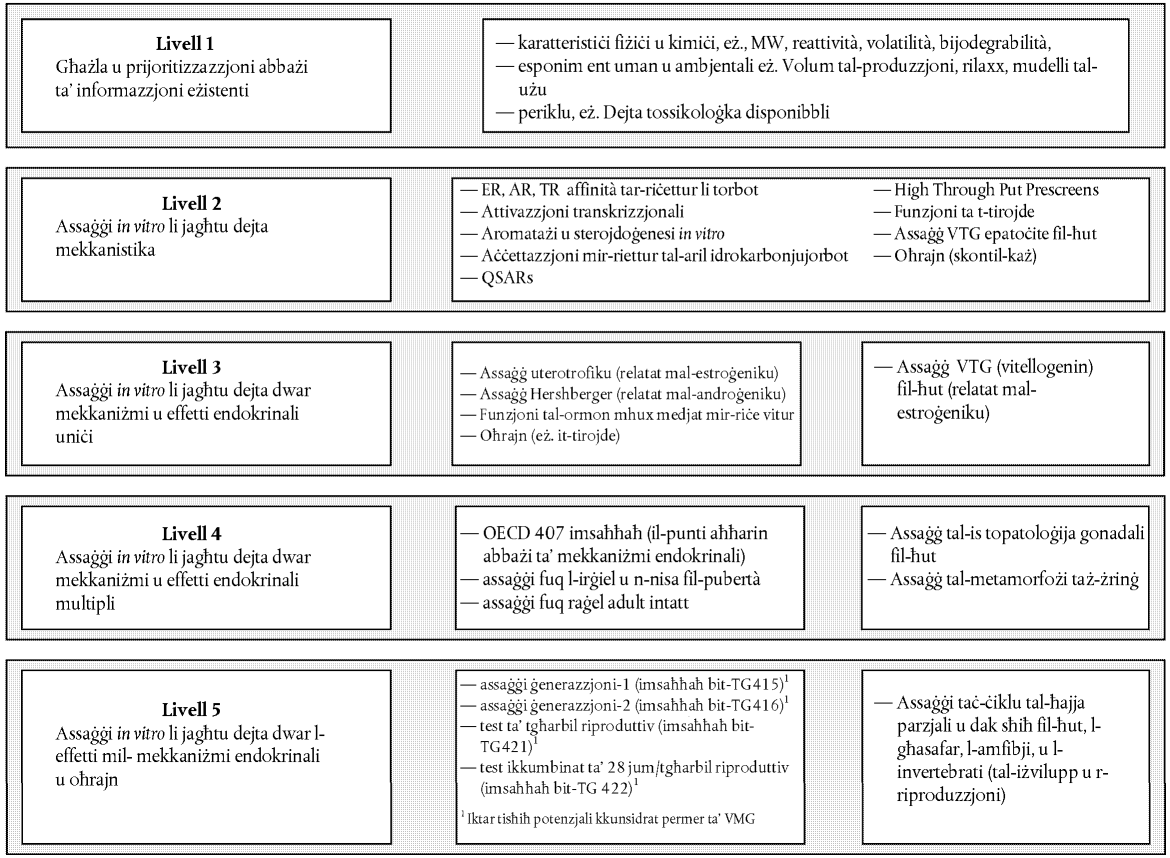
Validazzjoni hija proċess xjentifiku mfassal sabiex jikkaratterizza r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex juri l-affidabilità u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

▼M5

Appendiċi 2

Nota: Dokument imħejjimis Segretarjat tal-Programm tal-Lingji Gwida għat-Testijiet abbażi tal-ftehim milħuq fit-Sitt Laqgħa tat-TaskForce tal-EDTA

Il-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi li Jfixklu s-Sistema Endokrinali



VMG mamm: Grupp ta' Mmaniġġjar tal-Validazzjoni fuq Ittestjar u Valutazzjoni tal-Mammiferi

▼**M5**

NOTI GĦALL-QAFAS

Nota 1: Dħul fil-livelli kollha u ħruġ fil-livelli kollha huma possibbli u jiddependu fuq l-għamla tal-ħtiġijiet eżistenti ta' informazzjoni għal skopijiet ta' valutazzjoni tal-periklu u r-riskju

Nota 2: Fil-livell 5, l-ekotossikoloġija għandha tinkludi punti aħħarin li jindikaw mekkaniżmi ta' effetti avversi, u l-ħsara potenzjali għall-popolazzjoni

Nota 3: Meta mudell multimodali jkopri diversi mill-assaġġi tal-punt aħħari uniku, dak il-mudell jieħu post l-użu ta' dawk l-assaġġi tal-punt aħħari uniku

Nota 4: Il-valutazzjoni ta' kull sustanza kimika għandha tkun imsejsa fuq bażi ta' każ b'każ, filwaqt li tittieħed f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni, filwaqt li tibqa' mfakkra l-funzjoni tal-livelli tal-qafas.

Nota 5: Il-qafas ma għandux jitqies li jinkludi kollox bħalissa. Fil-livelli 3, 4 u 5 jinkludi assaġġi li jew huma disponibbli jew inkella li għalihom qed issir validazzjoni. Fir-rigward ta' dawn tal-aħħar, dawn huma inklużi b'mod provviżorju. Ladarba jiġu żviluppati u vvalidati, dawn ser jiżdiedu b'mod formali mal-qafas.

Nota 6: Il-livell 5 ma għandux jitqies li jinkludi testijiet definittivi biss. It-testijiet inklużi f'dak il-livell jitqiesu li jikkontribwixxu għall-valutazzjoni ġenerali tal-perikli u r-riskji.

▼M5

TAGHRIF

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 ta' Marzu 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/-MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650–651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425–427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369–373.

▼M5

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145–157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613–620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477–485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol.20:343–347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381–393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37:596–601.

(24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320–333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33–41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288–305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284–291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Pariġi.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401–416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1–2): 159–184.

(35) Booth AN, Bickoff EM u Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807–1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410–1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

▼M5

B.55. **BIJOASSAĠĠ HERSHBERGER F'FIRIEN: ASSAĠĠ TA' TGĦARBIL TA' TERMINU QASIR GĦAL PROPRJETAJIET (ANTI)ANDROĠENIĊI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) tal-OECD Nru 441 (2009). L-OECD nediet attività ta' prijorità għolja fl-1998 biex tirrevedi l-linji gwida eżistenti u tiżviluppa linji gwida ġodda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (1). Element minnhom tal-attività kien li tiżviluppa linja gwida tat-test għall-Bijoassaġġ Hershberger tal-firien. Wara għexieren ta' snin ta' użu mill-industrija farmaċewtika, dan l-assaġġ ġie standardizzat għall-ewwel darba minn kumitat uffiċjali tal-esperti fl-1962 bħala għodda tat-tgħarbil għal sustanzi kimiċi androġeniċi (2). Fl-2001-2007, il-Bijoassaġġ Hershberger tal-firien sarlu programm ta' validazzjoni estensiv inkluża l-ġenerazzjoni ta' Dokument ta' Reviżjoni ta' Sfond (23), kompilazzjoni ta' dokument tal-metodi dettaljati (3), l-iżvilupp ta' gwida dwar id-dissezzjoni (21) u t-twettiq ta' studji intra u interlaboratorji estensivi biex jintwerew l-affidabilità u r-riproduċibilità tal-bijoassaġġ. Dawn l-istudji ta' validazzjoni saru b'androġen ta' referenza qawwi (testosteron propjonat (TP)), żewġ androġeni sintetiċi qawwijin (trenbolon aċetat u metil testosteron), farmaċewtiku antiandroġeniku qawwi (flutamid), inibitur qawwi tas-sinteżi (finasterid) tal-androġen naturali (diidrotestosteron-DHT), bosta pestiċidi antiandroġeniċi dgħajfin (linuron, vinklożolina, proċimidon, p,p' DDE), inibitur qawwi ta' 5α ridottasi (finasterid) u żewġ sustanzi kimiċi negattivi magħrufin (dinitrofenol u nonilfenol) (4)(5)(6)(7)(8). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa r-riżultat tal-esperjenza storika twila bil-bijoassaġġ u l-esperjenza miksuba matul il-programm tat-test ta' validazzjoni u r-riżultati miksubin bih.

2. Il-Bijoassaġġ Hershberger huwa test ta' tgħarbil *in vivo* ta' terminu qasir li juża tessuti aċċessorji tal-apparat riproduttiv tal-irġiel. L-assaġġ oriġina fis-snin tletin u ġie modifikat fis-snin erbgħin biex jinkludi muskoli rispons-sivi għall-androġen fl-apparat riproduttiv tal-irġiel (2) (9-15). Fis-snin sittin, ġew evalwati iktar minn 700 androġen possibbli billi ntużat verżjoni standardizzata tal-protokoll (2)(14), u l-użu tal-assaġġ kemm għal androġeni kif ukoll għal antiandroġeni tqies li huwa metodu standard fis-snin sittin (2)(15). Il-bijoassaġġ kurrenti huwa bbażat fuq il-bidliet fil-piż ta' ħames tessuti li jiddependi fuq l-androġen fil-far raġel peripubertali msewwi. Jevalwa l-ħila ta' sustanza kimika li tniedi attivitajiet bijoloġiċi konsistenti mal-agonisti androġeni, antagonisti jew inibituri ta' 5α-ridottasi. Il-ħames tessuti fil-mira li jiddependu fuq l-androġen inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar huma l-prostata ventrali (VP), in-nuffata seminali (SV) (kif ukoll fluwidi u glandoli koagulanti), il-muskolu reffieġħ ani-bulbokavernosu (LABC), il-glandoli ta' Cowper flimkien (COW) u r-ras tal-pene (GP). Fil-far raġel peripubertali msewwi, dawn il-ħames tessuti kollha kemm huma jwieġbu għal androġeni b'żieda fil-piż assolut. Meta dawn l-istess tessuti jiġu stimolati biex jiżdiedu fil-piż permezz tal-għoti ta' androġen ta' referenza qawwi, dawn il-ħames tessuti kollha jwieġbu għall-antiandroġeni bi tnaqqis fil-piż assolut. Il-mudell primarju għall-bijoassaġġ Hershberger kien ir-raġel peripubertali msewwi b'kirurġija, li ġie validat fil-Fażijiet 1, 2 u 3 tal-programm ta' validazzjoni ta' Hershberger.

3. Il-Bijoassaġġ Hershberger iservi bħala assaġġ mekkanistiku ta' tgħarbil *in vivo* għal agonisti tal-androġen, antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5α-ridottasi u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi li Jfixklu

▼M5

s-Sistema Endokrinali” (Appendiċi 2). F'dan il-Qafas Kunċettwali, il-Bijoassaġġ Hershberger jinsab fil-Livell 3 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi dejta dwar mekkaniżmu endokrinali wieħed, jiġifieri (anti)androġeniċità. Huwa maħsub sabiex ikun inkluż f'serje ta' testijiet *in vitro* u *in vivo* biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi b'potenzjal li jinteraġixxu mas-sistema endokrinali, li finalment iwasslu għal valutazzjonijiet tal-periklu u r-riskju għas-saħħa tal-bniedem jew l-ambjent.

4. Minħabba tħassib relatat mal-benessri tal-annimali fil-proċedura ta' tiswija, intuża r-raġel intatt stimolat (mhux imsewwi) li jkun għadu kif infatam bħala mudell alternattiv għall-Bijoassaġġ Hershberger biex jiġi evitat il-pass tat-tiswija. Il-metodu tat-test tar-raġel stimolat li jkun għadu kif infatam ġie validat (24); madankollu, fl-istudji ta' validazzjoni, il-verżjoni tar-raġel li jkun għadu kif infatam tal-Bijoassaġġ Hershberger ma dehritx li kapaċi tidentifika effetti b'mod konsistenti fuq piżijiet tal-organi li jiddependu fuq androġen minn antiandroġeni dgħajfin bid-doża ttestjati. Għalhekk, ma kienx inkluż f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, peress li l-użu tiegħu jista' jipprovdi mhux biss benefiċċji għall-benessri tal-annimali iżda jista' jipprovdi wkoll informazzjoni dwar modi oħrajn ta' azzjoni, huwa disponibbli fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 115(25).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

5. L-agonisti u l-antagonisti tal-androġen jaġixxu bħala lega għar-riċettur tal-androġen u jistgħu jattivaw jew jinibixxu, rispettivament, it-traskrizzjoni tal-ġeni kkontrollata mir-riċettur. Barra minn hekk, ċerti sustanzi kimiċi jinibixxu l-konverżjoni ta' testosteron għall-androġenu naturali iktar qawwi diidrotestosteron f'xi tessuti tal-androġen fil-mira (inibituri ta' 5α-ridottasi). It-tali sustanzi kimiċi għandhom il-potenzjal li jwasslu għal perikli avversi għas-saħħa, inklużi effetti fuq ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp. Għalhekk, hemm bżonn regolatorju biex sustanza kimika tiġi vvalutata u evalwata malajr bħala agonist jew antagonist possibbli tal-androġen jew inibitur ta' 5α-ridottasi. Filwaqt li informattiva, l-affinità tal-lega għal riċettur tal-androġen kif imkejla permezz tar-rabta tar-riċettur jew l-attivazzjoni transkrizzjonali tal-ġeni rapportaturi *in vitro* mhijiex l-uniku determinant ta' periklu possibbli. Determinanti oħrajn jinkludu attivazzjoni u diżattivazzjoni metaboliċi malli jidħlu fil-ġisem, distribuzzjoni kimika biex jimmiraw għal tessuti, u tneħħija mill-ġisem. Dan iwassal għall-bżonn li titgħarbel l-attività possibbli ta' sustanza kimika *in vivo* f'kundizzjonijiet u esponiment rilevanti. L-evalwazzjoni *in vivo* hija inqas kritika jekk ikunu magħrufin il-karatteristiċi tas-sustanza kimika rigward Assorbiment –Distribuzzjoni — Metaboliżmu — Eliminazzjoni (ADME). Tessuti li jiddependu fuq androġen iwieġbu bi tkabbir rapidu u qawwi għall-istimolu minn androġeni, b'mod partikolari f'firien irġiel peripubertali msewwijin. Speċi rodituri, b'mod partikolari l-far, jintużaw spiss ukoll fl-istudji dwar it-tossiċità għall-karatterizzazzjoni tal-perikli. B'hekk, il-verżjoni l-assaġġ, li tuża l-far peripubertali msewwi u l-ħames tessuti fil-mira f'dan l-assaġġ, hija xierqa għat-tgħarbil *in vivo* ta' agonisti u antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5α-ridottasi.

6. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq dawk il-protokolli mħaddmin fl-istudju ta' validazzjoni tal-OECD li ntwera li huma affidabbli u riproduċibbli fi studji intra u interlaboratorji (4)(5)(6)(7)(8). Kemm il-proċeduri androġeni kif ukoll dawk antiandroġeni huma ppreżentati f'dan il-metodu ta' ttestjar.

7. Għad li kien hemm xi varjazzjoni fid-doża tat-TP użata biex jiġu identifikati antiandroġeni fil-programm tal-OECD ta' validazzjoni tal-Bijoassaġġ mil-laboratorji differenti (0,2 versus 0,4 mg/kg/d, tilqima taħt il-ġilda), ftit li xejn kien hemm differenza bejn dawn iż-żewġ varjazzjonijiet fil-protokoll fil-ħila biex jaqbdu attività antiandroġenika dgħajfa jew qawwija. Madankollu, huwa ċar li d-doża tat-TP ma għandhiex tkun għolja wisq tant li timblokka l-effetti ta' antagonisti dgħajfin tar-riċettur tal-androġenu (AR) jew baxxa wisq tant li t-tessuti androġeniċi juru rispons tat-tkabbir batut anki mingħajr il-koamministrazzjoni tal-antiandroġen.

▼M5

8. Ir-rispons tat-tkabbir tat-tessuti individwali li jiddependu fuq l-androġen mhuwiex ta' oriġini kompletament androġenika, jiġifieri sustanzi kimiċi minbarra agonisti androġeni li jibdlu l-piż ta' ċerti tessuti. Madankollu, ir-rispons għat-tkabbir ta' bosta tessuti fl-istess ħin isostni mekkaniżmu iktar speċifiku għall-androġen. Pereżempju, dożi għoljin ta' estroġeni qawwijin jistgħu jżidu l-piż tal-infafet seminali; madankollu, it-tessuti l-oħrajn li jiddependu fuq l-androġen fl-assaġġ ma jwiġbux b'mod simili. Is-sustanzi kimiċi antiandroġeniċi jistgħu jaġixxu jew bħala antagonitsi tar-riċetturi androġeni jew inibituri ta' 5α-ridottasi. L-inibituri ta' 5α-ridottasi għandhom effett varjabbli, għaliex il-konverżjoni għal diidrotestosteron iktar qawwi tvarja skont it-tessut. L-antiandroġeni li jinibixxu 5α — ridottasi, bħal finasterid, għandhom effetti li jinħassu iktar fil-prostata ventrali minn tessuti oħrajn meta mqabblin ma' antagonist AR qawwi, bħal flutamid. Din id-differenza fir-rispons tat-tessut tista' tintuża biex tinħareġ differenza bejn modi ta' azzjoni medjati b'AR u dawk medjati b'5α — ridottasi. Barra minn hekk, ir-riċettur tal-androġen huwa relatat fil-livell tal-evoluzzjoni ma' dak ta' ormoni tal-isterojdi oħrajn, u xi ormoni oħrajn, meta jingħata b'livelli ta' dożaġġ għoljin suprafiżjoloġiċi, jista' jwaħħal u jantagonizza l-effetti tat-TP li jippromwovu t-tkabbir (13). Barra minn hekk, huwa plawżibbli wkoll li metaboliżmu msaħħaħ tal-isterojdi u t-tnaqqis konsegwenti tat-testosteron tas-serum jistgħu jnaqqsu t-tkabbir tat-tessuti li jiddependu fuq l-androġen. Għalhekk, kwalunkwe eżitu pożittiv fil-Bijoassaġġ Hershberger normalment għandu jiġi evalwat billi jintuża approċċ ta' piż tal-evidenza, inklużi assaġġi *in vitro*, bħall-assaġġi vinkolanti tal-AR u tar-riċetturi tal-estroġen (ER) u l-assaġġi ta' attivazzjoni transkrizzjonali korrispondenti, jew minn assaġġi *in vivo* oħrajn li jeżaminaw tessuti simili tal-androġen fil-mira bħall-assaġġ pubertali tal-irġiel, l-assaġġ tal-irġiel adulti intatti ta' 15-il jum, jew studji ta' doża ripetuta ta' 28 jum jew 90 jum.

9. L-esperjenza tindika li androġeni ksenobijotiċi huma iktar rari minn antiandroġeni ksenobijotiċi. Allura huwa mistenni li l-bijoassaġġ Hershberger ser jintuża spiss għat-tgħarbil ta' antiandroġeni. Madankollu, il-proċedura għall-ittestjar għal androġeni xorta waħda tista' tkun rakkomandata għal sustanzi kimiċi sterojdali jew simili għall-isterojdi jew għal sustanzi kimiċi li għalihom indikazzjoni tal-effetti androġeniċi possibbli nġiebet minn metodi li jinsabu fil-Livell 1 jew 2 tal-qafas kunċettwali (Appendiċi 2). B'mod simili, effetti avversi assoċjati ma' profili (anti)androġeniċi jistgħu jkunu osservati fl-assaġġi tal-Livell 5, li jwasslu għall-bżonn li jiġi vvalutat jekk sustanza kimika toperax permezz ta' mod ta' azzjoni endokrinali.

10. Huwa rikonoxxut li l-proċeduri kollha bbażati fuq l-annimali għandhom ikunu konformi mal-istandards lokali tal-indukrar tal-annimali; id-deskrizzjonijiet tal-indukrar u l-kura stabbiliti hawn taħt huma standards minimi tal-prestazzjoni, u ser jiġu sostiwtiti minn regolamenti lokali bħad-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (26). Iktar gwida dwar it-trattament umanitarju tal-annimali tingħata mill-OECD (17).

11. Bħal fi kwalunkwe bijoassaġġ li juża annimali sperimentali, għandha tingħata kunsiderazzjoni attenta għall-ħtieġa li jitwettaq dan l-istudju. Bażikament, jista' jkun hemm żewġ raġunijiet għal deċiżjoni bħal din:

— potenzjal ta' esponiment għoli (Livell 1 tal-Qafas Kunċettwali) jew indikazzjonijiet għal (anti)androġeniċità f'assaġġi *in vitro* (Livell 2) li jappoġġjaw investigazzjonijiet dwar jekk it-tali effetti jistgħux iseħħu *in vivo,*

— effetti konsistenti ma' (anti)androġeniċità f'testijiet *in vivo* tal-Livell 4 jew 5 li jsostnu investigazzjonijiet tal-mod ta' azzjoni speċifiku, eż., biex jiġi determinat jekk l-effetti kinux dovuti għal mekkaniżmu (anti)androġeniku.

▼**M5**

12. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

13. Il-Bijoassaġġ Hershberger jikseb is-sensittività tiegħu billi juża rġiel bi produzzjoni minima ta' androġen endoġenu. Dan jinkiseb permezz tal-użu ta' rġiel imsewwijin diment li jingħata biżżejjed żmien wara t-tiswija biex jiġu mmirati tessuti għar-rigress lejn piż bażi minimu u uniformi. B'hekk, meta jsir tgħarbil tal-attività androġenika potenzjali, hemm livelli endoġenużi baxxi ta' androġeni ċirkolanti, l-assi ipotalamiku — pitwitarju — gonadi ma jibqax kapaċi jikkumpensa permezz ta' mekkaniżmi ta' tagħlif, il-ħila tat-tessuti biex iwieġbu tkun massimizzata, u l-varjabbiltà tal-piż tat-tessut tal-bidu tiġi minimizzata. Meta jsir tgħarbil ta' attività antiandroġenika potenzjali, tista' tinkiseb żieda iktar konsistenti fil-piż tat-tessut meta t-tessuti jkunu stimolati permezz ta' androġen ta' referenza. B'hekk, il-Bijoassaġġ Hershberger jeħtieġ biss 6 annimali għal kull grupp tad-doża filwaqt li assi oħrajn bi rġiel pubertali jew adulti intatti jissuġġerixxu li jintużaw 15-il raġel f'kull grupp ta' doża.

14. It-tiswija ta' firien irġiel peripubertali għandha ssir b'mod xieraq billi jintużaw anastetiċi u teknika asettika approvati. L-analġeżiċi għandhom jingħataw fl-ewwel ftit jiem wara l-kirurġija biex tiġi eliminata skumditàta' wara l-kirurġija. It-tiswija ssaħħaħ il-preċiżjoni tal-assaġġ biex jinqabdu androġeni u antiandroġeni batuti billi telimina mekkaniżmi kompensatorji endokrinali ta' rispons preżenti fl-annimal intatt li jistgħu jtaffu l-effetti tal-androġeni u l-antiandroġeni mogħtijin u billi tiġi eliminata l-varjabbiltà kbira bejn l-individwi f'livelli tat-testosteron tas-serum. B'hekk, it-tiswija tnaqqas in-numri ta' annimali meħtieġa li jitgħarblu għal dawn l-attivitajiet endokrinali.

15. Meta jsir tgħarbil għal attività androġenika potenzjali, is-sustanza kimika tat-test tingħata kuljum permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda (sc) għal perjodu ta' għaxart ijiem konsekuttivi. Is-sustanzi kimiċi tat-test jingħataw lil tal-inqas żewġ gruppi tal-kura ta' annimali sperimentali li jużaw livell wieħed ta' doża għal kull grupp. L-annimali huma nekropsjati madwar 24 siegħa wara l-aħħar doża. Żieda statistikament sinifikanti f'żewġ piżijiet ta' organi fil-mira jew iktar tal-gruppi tas-sustanzi kimiċi tat-test imqabblin mal-grupp ta' kontroll veikolu tindika li s-sustanza kimika tat-test hija pożittiva għal attività androġenika potenzjali (Ara l-paragrafu 60). L-androġeni, bħal trenbolon, li ma jistax ikun 5α — ridott għandhom effetti li jinħassu iktar fuq l-LABC u l-GP meta mqabblin mat-TP, iżda t-tessuti kollha għandhom juru tkabbir miżjud.

16. Meta jsir tgħarbil għal attività antiandroġenika potenzjali, is-sustanza kimika tat-test tingħata kuljum permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda għal perjodu ta' għaxart ijiem konsekuttivi flimkien ma' doži kuljum tat-TP (0,2 jew 0,4 mg/kg/jum) permezz ta' tilqima sc. Kien determinat fil-programm ta' validazzjoni li 0,2 jew 0,4 mg/kg/jum ta' TP jistgħu jintużaw peress li t-tnejn kienu effettivi fil-qbid ta' antiandroġeni u, għalhekk, doża waħda biss għandha tingħażel sabiex tintuża fl-assaġġ. Doži approvati tas-sustanza kimika tat-test jingħataw lil tal-inqas tliet gruppi tal-kura mill-annimali sperimentali billi jintuża livell ta' doża wieħed għal kull grupp. L-annimali jiġu nekropsjati madwar 24 siegħa wara l-aħħar doża. Tnaqqis statistikament sinifikanti f'żewġ piżijiet ta' organi fil-mira jew iktar tas-sustanza kimika tat-test flimkien mal-gruppi tat-TP imqabblin mal-grupp ta' kontroll b'TP biss jindika li s-sustanza kimika tat-test hija pożittiva għal attività antiandroġenika potenzjali (Ara l-paragrafu 61).

▼M5

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċi u r-razza

17. Il-far intuża spiss fil-Bijoassaġġ Hershberger sa mis-snin tletin. Għad li huwa bijoloġikament plawżibbli li kemm il-far kif ukoll il-ġurdien juru risponsi simili, fuq il-bażi ta' 70 sena esperjenza bil-mudell tal-far, il-far huwa l-ispeċi tal-għażla għall-Bijoassaġġ Hershberger. Barra minn hekk, peress li d-dejta tal-Bijoassaġġ Hershberger tista' tkun preliminari għal studju pluriġenerazzjonali fit-tul, dan jippermetti sabiex annimali mill-istess speċi, razza u sors jintużaw fiż-żewġ studji.

18. Dan il-protokoll jippermetti sabiex il-laboratorji jagħżlu r-razza ta' far li għandha tintuża fl-assaġġ li ġeneralment għandha tkun dik użata storikament mil-laboratorju li jieħu sehem. Jistgħu jintużaw ir-razez ta' firien tal-laboratorju użati spiss; madankollu, razez li jimmaturaw ferm wara li jgħalqu t-42 jum ma għandhomx jintużaw peress li tiswija ta' dawn l-irġiel meta jkollhom 42 jum tista' tipprekludi l-kejl tal-piżijiet tar-ras tal-pene, li jista' jsir biss wara li l-prepuzju jiġi separat mill-korp tal-pene. B'hekk, razez li ġejjin mill-far Fisher 344 ma għandhomx jintużaw, ħlief f'każijiet rari. Il-far Fisher 344 għandu durati differenti tal-fażijiet tal-iżvilupp sesswali meta mqabbel ma' razez oħrajn użati iktar spiss bħar-razez Sprague Dawley jew Wistar (16). Jekk tintuża din ir-razza, il-laboratorju għandu jsewwihom f'età ftit ikbar u għandu jkun kapaċi juri s-sensittività tar-razza użata. Ir-raġuni għall-għażla tar-razza tal-far għandha tiġi ddikjarata b'mod ċar mil-laboratorju. Meta l-assaġġ tat-tgħarbil jista' jkun preliminari għal studju orali b'doża ripetuta, studju dwar ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp, jew studju fit-tul, idealment intużaw annimali mill-istess razza u sors fl-istudji kollha.

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-għalf

19. Il-proċeduri kollha għandhom jikkonformaw mal-istandards lokali kollha dwar l-indukrar tal-annimali tal-laboratorju. Dawn id-deskrizzjonijiet ta' indukrar u kura huma standards minimi u ser jiġu sostitwiti minn regolamenti lokali iktar stringenti, bħad-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (26). It-temperatura fil-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun 22 °C (b'medda ta' madwar ± 3 °C). L-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas 30 % u idealment ma għandhiex taqbeż massimu ta' 70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra. Il-mira għandha tkun umdità relattiva ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali. Is-sekwenza tad-dawl ta' kuljum għandha tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam.

20. It-trobbija f'post fi grupp hija ppreferuta iktar minn iżolament minħabba l-età żgħira tal-annimali u l-fatt li l-firien huma annimali soċjali. It-trobbija fi grupp ta' żewġ jew tliet annimali f'kull gaġġa tevita ffullar u stress assoċjat li jistgħu jinterferixxu mal-kontroll ormonali tal-iżvilupp tat-tessut aċċessorju tas-sess. Il-gaġeġ għandhom jitnaddfu sew biex jinteħħew kontaminanti possibbli u jiġu rranġati b'tali mod li jiġu minimizzati l-effetti possibbli dovuti għall-pożizzjoni tal-gaġġa. Il-gaġeġ ta' daqs xieraq (~2 000 ċentimetru kwadru) ser jevitaw iffullar.

21. Kull annimal għandu jkun identifikat b'mod individwali (eż., marka jew tikketta mal-widna) billi jintuża metodu umanitarju. Il-metodu ta' identifikazzjoni għandu jiġi rreġistrat.

▼M5

22. Id-dieta tal-laboratorju u l-ilma tajjeb għax-xorb għandhom jiġu pprovduti *ad libitum*. Il-laboratorju li jagħmlu l-Bijoassaġġ Hershberger għandhom jużaw id-dieta tal-laboratorju li normalment jużaw fil-ħidma tagħhom ta' ttestjar ta' sustanzi kimiċi. Fl-istudji ta' validazzjoni tal-Bijoassaġġ, ma ġew osservati ebda effett jew varjabbiltà li kienu attribwibbli għad-dieta. Id-dieta użata ser tiġi rreġistrata u għandu jinżamm kampjun tad-dieta tal-laboratorju għal analiżi possibbli fil-ġejjieni.

Il-kriterji ta' prestazzjoni għal piżijiet ta' organi li jiddependi fuq androġen

23. Matul l-istudju ta' validazzjoni, ma kien hemm ebda evidenza li tnaqqis fil-piż tal-ġisem affettwa żidiet jew tnaqqisijiet fit-tkabbir tal-piżijiet tat-tessut għal tessuti fil-mira (jiġifieri, li għandhom jintiżnu f'dan l-istudju).

24. Fost ir-razez differenti ta' firien użati b'suċċess fil-programm ta' validazzjoni, il-piżijiet ta' organi li jiddependi fuq androġen huma ikbar fir-razez itqal ta' firien meta mqabblin ma' razez eħfef. Għalhekk, il-kriterji ta' prestazzjoni tal-Bijoassaġġ Hershberger ma jinkludux piżijiet tal-organi assoluti mistennija għal kontrolli pożittivi u negattivi.

25. Peress li l-Koeffiċjent tal-Varjazzjoni (CV) għal tessut għandu relazzjoni inversa mas-saħħa statistika, il-kriterji ta' prestazzjoni tal-Bijassaġġ Hershberger huma bbażati fuq valuri massimi tas-CV għal kull tessut (Tabella 1). Is-CVs jittieħdu mill-istudji ta' validazzjoni tal-OECD. Fil-każ ta' riżultati negattivi, il-laboratorji għandhom jeżaminaw is-CVs mill-grupp ta' kontroll u l-grupp ta' kura b'doża għolja biex jiddeterminaw jekk inqabżux il-kriterji ta' prestazzjoni massimi tas-CV.

26. L-istudju għandu jkun ripetut meta: 1) tlieta jew iktar mill-għaxar CVs individwali possibbli fil-gruppi ta' kontroll u ta' kura b'doża għolja jaqbżu l-massimi magħżulin għal studji ta' agonisti u antagonisti fit-Tabella 1 u 2) tal-inqas żewġ tessuti fil-mira kienu marġinalment insinifikanti, jiġifieri, valuri ta' ρ bejn 0,05 u 0,10.

Tabella 1

CVs massimi awtorizzabbli Determinati għat-Tessuti Aċċessorji tas-Sess fil-Mira għall-mudell imsewwi fl-Istudji ta' Validazzjoni tal-OECD ([1])

Tessut	Effetti antiandroġeniċi	Effetti androġeniċi
Infafet seminali	40 %	40 %
Prostata ventrali	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Glandoli ta' Cowper	35 %	55 %
Ras tal-pene	17 %	22 %

([1]) Is-CV limitu għal tessut partikolari ġie identifikat minn graff ta' valuri tas-CV — irranġat mill-iżgħar b'mod sekwenzjali sal-ikbar — għall-mezzi kollha mill-esperimenti kollha fl-eżerċizzju ta' validazzjoni billi ntuża mudell speċifiku (agonist jew antagonist). Is-CV limitu nqara mill-punt li fih l-inkrementi fin-nofs sal-ogħla CVs li jmiss fis-serje huma bil-bosta ikbar mill-ftit CVs ta' qabel — il-"valur kritiku". Ta' min jinnota li għad li din l-analiżi identifikat "valuri kritiċi" relattivament affidabbli għall-mudell ta' antagonist tal-assaġġ, il-kurvi tas-CV għall-assaġġ ta' agonist uriet żieda iktar uniformi sabiex b'hekk, l-identifikazzjoni ta' CV limitu b'dan il-metodu saret kemxejn arbitrarja.

▼M5

PROĊEDURA

Konformità regolatorja u verifika tal-laboratorju

27. Għall-kuntrarju tal-assaġġ Utertrofiku (Kapitolu B.54 ta' dan l-Anness), wiri tal-konformità tal-laboratorju qabel it-tnedija tal-istudju mhijiex neċessarja għall-assaġġ Hershberger għaliex kontrolli pożittivi (Testosteron Propjonat u Flutamid) u negattivi fl-istess ħin isiru bħala parti integrali tal-assaġġ.

In-numru u l-kundizzjoni tal-annimali

28. Kull grupp ikkurat u tal-kontroll għandu jinkludi minimu ta' 6 annimali. Dan japplika kemm għall-protokoll androġeniku kif ukoll antiandroġeniku.

Tiswija

29. Għandu jkun hemm perjodu inizjali ta' akklimatizzazzjoni ta' bosta jiem wara r-riċevuta tal-annimali biex jiġi żgurat li l-annimali huma b'saħħithom u jikbru sew. Peress li annimali msewwijin qabel ma jgħalqu 42 jum jew il-jum ta' wara t-twelid (pnd) 42 jistgħu ma jurux separazzjoni prepuzjali, l-annimali għandhom jissewwew fil-pnd 42 jew wara, u mhux qabel. L-annimali jissewwew taħt anesteżija billi ssir inċiżjoni fl-iskrotu u jitneħħew iż-żewġ testikoli u l-epididimidi b'ligatura tal-vini tad-demm u l-passaġġi seminali. Wara l-konfrma li ma jkun qed hemm l-ebda fsad, l-iskrotu għandu jingħalaq b'sutura jew autoclips. L-annimali għandhom jiġu kkurati b'analġeżiċi għall-ewwel ftit jiem wara l-kirurġija biex tittaffa kwalunkwe skumditàta' wara l-kirurġija. Jekk l-annimali msewwijin jinxtraw minn fornitur tal-annimali, l-età tal-annimali u l-istadju tal-maturità sesswali għandhom ikunu żgurati mill-forniturі.

Akklimatizzazzjoni wara t-tiswija

30. L-annimali għandhom ikomplu bl-akklimatizzazzjoni fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju biex tkun tista' ssir ir-rigressjoni fil-piżijiet tat-tessut fil-mira għal tal-inqas 7 ijiem wara t-tiswija. L-annimali għandhom ikunu osservati kuljum, u kwalunkwe annimal b'evidenza ta' marda jew anormalitajiet fiżiċi għandu jitneħħa. B'ħekk, il-kura permezz ta' bidu tad-dożaġġ (fl-istudju) tista' tibda mindu jgħalqu pnd 49 jum, iżda mhux wara l-pnd 60. L-età meta ssir in-nekropsija ma għandhiex tkun iktar mill-pnd 70. Din il-flessibilità tippermetti sabiex laboratorju jiskeda l-ħidma sperimentali b'mod effiċjenti.

Piż tal-ġisem u gruppi aleatorji

31. Id-differenzi fil-piżijiet tal-ġisem individwali huma sors ta' varjabbiltà fil-piżijiet tat-tessut kemm fi ħdan kif ukoll fost gruppi ta' annimali. Iżżieda fil-vjarbabiltà tal-piż tat-tessut tirriżulta f'koeffiċjent tal-varjazzjoni (CV) miżjud u tnaqqas is-saħħa statistika tal-assaġġ (kultant imsejħa s-sensitività tal-assaġġ). Għalhekk, varjazzjonijiet fil-piż tal-ġisem għandhom ikunu kkontrollati kemm b'mod sperimentali kif ukoll statistiku.

32. Il-kontroll sperimentali jinvolvi l-produzzjoni ta' varjazzjonijiet żgħar fil-piż tal-ġisem fi ħdan u fost il-gruppi ta' studju. L-ewwel nett, annimali żgħar jew kbar wisq għandhom jiġu evitati u ma jitqegħdux fil-grupp tal-istudju. Mal-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni tal-piż tal-annimali ma għandhiex taqbeż ± 20 % tal-piż medju (eż. 175 g ± 35 g għal firien peripubertali msewwijin). It-tieni, l-annimali għandhom ikunu assenjati fi gruppi (kemm ta' kontroll kif ukoll tal-kura) permezz ta' distribuzzjoni tal-piż b'mod aleatorju, sabiex il-piż medju tal-ġisem ta' kull grupp ma jkunx statistikament differenti minn xi grupp ieħor. Il-proċedura blokk ta' tqassim aleatorju użata għandha tiġi rreġistrata.

▼M5

33. Peress li t-tossiċità tista' tnaqqas il-piż tal-ġisem tal-gruppi kkurati fir-rigward tal-grupp ta' kontroll, il-piż tal-ġisem fl-ewwel jum tal-għoti tas-sustanza kimika tat-test jista' jintuża bħala kovarjant statistiku, mhux il-piż tal-ġisem fin-nekropsija.

Dożaġġ

34. Sabiex jiġi stabbilit jekk sustanza kimika tat-test jistax ikollha azzjoni androġenika *in vivo*, żewġ gruppi ta' doża tas-sustanza kimika tat-test flimkien ma' kontrolli pożittivi u veikoli (negattivi) (Ara l-paragrafu 43) normalment ikunu biżżejjed, u għalhekk, dan id-disinn huwa ppreferut għal raġunijiet ta' benessri tal-annimali. Jekk l-iskop ikun li jew tinkiseb kurva ta' rispons għad-doża jew li ssir estrapolazzjoni għal dożi inferjuri, tal-inqas ikun hemm bżonn ta' 3 gruppi ta' doża. Jekk ikun hemm bżonn ta' informazzjoni minbarra identifikazzjoni tal-attività androġenika (bħal stima tal-potenza), għandha tiġi kkunsidrata skeda differenti tad-dożaġġ. Biex isiru testijiet għal antiandroġeni, is-sustanza kimika tat-test tingħata flimkien ma' agonist tal-androġen ta' referenza. Għandhom jintużaw tal-inqas 3 gruppi ta' ttestjar b'dożi differenti tas-sustanza kimika tat-test u kontroll pożittiv u negattiv (Ara l-paragrafu 44). Ħlief għat-trattament bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu fl-għoti tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat bil-gruppi tat-test.

35. Il-livelli kollha ta' doża għandhom ikunu proposti u jingħażlu filwaqt li titħeħed f'kunsiderazzjoni kwalunkwe dejta (tossiko)kinetika u dwar it-tossiċità eżistenti u għad-dispożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test jew materjali relatati. L-ewwel nett, l-ogħla livell ta' doża għandu jieħu f'kunsiderazzjoni l-LD_{50} u/jew informazzjoni dwar it-tossiċità akuta sabiex jiġu evitati mewt, tbatija severa jew diffikultà fl-annimali (17)(18)(19)(20) u, it-tieni, jieħu f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni disponibbli dwar id-dożi użati fi studji sottokroniċi u kroniċi. B'mod ġenerali, l-ogħla doża ma għandhiex tikkaġuna tnaqqis fil-piż finali tal-ġisem tal-annimali iktar minn 10 % tal-piż ta' kontroll. L-ogħla doża għandha tkun jew 1) l-ogħla doża li tiżgura sopravvivenza tal-annimali u li hija mingħajr tossiċità jew diffikultà importanti għall-annimali wara 10 ijiem konsekuttivvi ta' għoti sa doża massima ta' 1 000 mg/kg/jum (Ara l-paragrafu 36) jew 2) doża li tinduċi effetti (anti)androġeniċi, skont liema tkun l-inqas. Għat-tgħarbil, intervalli kbar, eż. unitajiet ta' nofs log (li jikkorrispondu għal progressjoni tad-doża ta' 3,2) jew anki unitajiet ta' log waħda, bejn dożaġġi ġeneralment huma aċċettabbli. Jekk ma hemm ebda dejta xierqa disponibbli, jista' jsir studju ta' sejbien tal-medda (Ara l-paragrafu 37) biex jgħin fid-determinazzjoni tad-dożi li għandhom jintużaw.

Livell tad-doża ta' limitu

36. Jekk test fid-doża ta' limitu ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum u doża inqas li juża l-proċeduri deskritti għal dan l-istudju jonqos milli jipproduċi bidla statistikament sinifikanti fil-piżijiet tal-organi riproduttivi, f'dak il-każ, livelli addizzjonali ta' dożi jistgħu jitqiesu mhux neċessarji. Id-doża ta' limitu tapplika ħlief meta dejta dwar esponiment tal-bniedem tindika l-bżonn li jintuża livell ta' doża ogħla.

Kunsiderazzjonijiet għas-sejba tal-medda

37. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jsir studju preliminari ta' sejbien tal-medda bi ftit annimali sabiex jingħażlu gruppi ta' doża xierqa [billi jintużaw metodi għall-ittestjar tat-tossiċità akuta (Kapitoli B.1 bis, B.1 tris ta' dan l-Anness (27), TG tal-OECD Nru 425 (19))]. L-għan fil-każ tal-Bijoassaġġ Hershberger huwa li jagħżel dożi li jiżguraw sopravvivenza tal-annimali u li huma ħielsa minn tossiċità jew diffikultà importanti għall-annimali wara għaxart

▼M5

ijiem konsekuttivi ta' għoti tas-sustanza kimika sa doża limitu ta' 1 000 mg/kg/jum kif stipulat fil-paragrafi 35 u 36. F'dan ir-rigward jista' jintuża Dokument Gwida tal-OECD (17) li jiddefinixxi sinjali kliniċi li jindikaw tossiċità jew diffikultà fl-annimali. Jekk fattibbli fi ħdan dan l-istudju ta' sejbien tal-medda wara għaxart ijiem ta' għoti, it-tessuti fil-mira jistgħu jinqatgħu u jintiżnu madwar 24 siegħa wara li tingħata l-aħħar doża. Imbagħad din id-dejta tkun tista' tintuża biex tgħin fl-għażla tad-dożi fl-istudju ewlieni.

Sustazi kimiċi ta' referenza u veikolu

38. L-agonist tal-androġen ta' referenza għandu jkun Testosteron Propjonat (TP), Nru tas-CAS 57-82-5. Id-dożaġġ ta' referenza tat-TP jista' jkun jew 0,2 mg/kg-bw/jum jew inkella 0,4 mg/kg-bw/jum. L-antagonist tal-androġen ta' referenza għandu jkun Flutamid (FT), Nru tas-CAS 1311-84-7. Id-dożaġġ ta' referenza tal-FT għandu jkun ta' 3 mg/kg-bw/jum, u l-FT għandu jingħata flimkien mad-dożaġġ ta' referenza tat-TP.

39. Huwa rakkomandat li, kull fejn ikun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni milwiema/sospensjoni. Madankollu, peress li ħafna ligandi tal-androġeni jew il-prekursuri metaboliċi tagħhom għandhom it-tendenza li jkunu idrofobiċi, l-iktar approċċ komuni huwa li tintuża soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħirrun, tal-karawett, tal-ġungħlien jew taż-żebbuġ). Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinħallu f'ammont minimu ta' 95 % etanol jew solventi xierqa oħrajn u jiġu dilwiti f'konċentrazzjonijiet ta' użu finali fil-veikolu tat-test. Il-karatteristiċi tossiċi tas-solvent għandhom ikunu magħrufin, u għandhom ikunu ttestjati fi grupp ta' kontroll separat b'solvent biss. Jekk is-sustanza kimika tat-test titqies stabbli, tista' tintuża azzjoni mekkanika ħafifa ta' tisħin u b'saħħitha biex tgħin ħalli tinħall is-sustanza kimika tat-test. Għandha tiġi determinata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu. Jekk is-sustanza kimika tat-test hija stabbli għad-durata tal-istudju, ikun jista' jitħejja alikwot tal-bidu tas-sustanza kimika tat-test, u d-dilwizzjonijiet speċifikati tad-dożaġġ ippreparati ta' kuljum b'attenzjoni biex jiġu evitati kontaminazzjoni u ħela tal-kampjuni.

L-għoti tad-dożi

40. It-TP għandu jingħata permezz ta' tilqima taħt il-ġilda, u l-FT permezz ta' gavage orali.

41. Is-sustanza kimika tat-test tingħata permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda. Kunsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali u l-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi tas-sustanza kimika tat-test iridu jitqiesu meta tingħażel ir-rotta tal-amministrazzjoni. Barra minn hekk, għandhom jittieħdu f'kunsiderazzjoni aspetti tossikoloġiċi bħar-relevanza għar-rotta ta' esponiment tal-bniedem għas-sustanza kimika (eż. gavage orali biex tiġi simulata inġestjoni, tilqima taħt il-ġilda biex jiġi simulat teħid man-nifs jew adsorbiment dermali) u informazzjoni tossikoloġika eżistenti u dejta dwar il-metaboliżmu u l-kinetika (eż. il-bżonn li jiġi evitat metaboliżmu first pass, effiċjenza aħjar b'rotta partikolari) qabel ma jinbeda ttestjar estensiv fit-tul, jekk jinkisbu riżultati pożittivi permezz tat-tilqima.

42. L-annimali għandhom jingħataw doża bl-istess mod u sekwenza ta' ħin għal għaxart ijiem konsekuttivi b'intervalli ta' madwar 24 siegħa. Il-livell ta'dożaġġ għandu jiġi aġġustat kuljum fuq il-bażi tal-kejl konkurrenti ta' kuljum tal-piż tal-ġisem. Il-volum tad-doża u l-ħin li tingħata għandu jiġi rreġistrat f'kull jum ta' esponiment. Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma tinqabiżx id-doża massima deskritta fil-paragrafu 35 biex tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Tnaqqis fil-piż tal-ġisem, sinjali kliniċi u sejbiet oħrajn għandhom jiġu vvalutati f'dettall f'dan ir-rigward. Għal gavage

▼M5

orali, għandhom jintużaw tubu tal-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Għandhom ikunu segwiti l-linji gwida lokali dwar l-indukrar tal-annimali, iżda l-volum ma għandux jaqbeż il-5 ml/kg piż tal-ġisem, ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża 10 ml/kg piż tal-ġisem. Għal tilqimiet taħt il-ġilda, id-dożi għandhom jingħataw fir-reġjuni dorsoskapulari u/jew lombari permezz ta' labra sterili (eż. ħxuna ta' 23 jew 25) u siringa tuberkulina. It-tqaxxir tas-sit tat-tilqima huwa fakultattiv. Għandhom jiġu rreġistrati kwalunkwe telf, tnixxija fis-sit tat-tilqima jew dożaġġ inkomplut. Il-volum totali injettat lil kull far kuljum ma għandux jaqbeż iż-0,5 ml/kg piż tal-ġisem.

Proċeduri speċifiċi għal agonisti tal-androġen

43. Għat-test għal agonisti tal-androġen, il-veikolu huwa l-kontroll negattiv, u l-grupp ikkurat b'TP huwa l-kontroll pożittiv. L-attività bijoloġika konsistenti ma' agonisti tal-androġen hija ttestjata bl-għoti ta' sustanza kimika tat-test lil gruppi tal-kura bid-dożi magħżulin għal 10 ijiem konsekuttivi. Il-piżijiet tal-ħames tessuti aċċessorji tas-sess mill-gruppi tas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mal-grupp veikolu għal żidiet statistikament importanti fil-piż.

Proċeduri speċifiċi għal antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5α-ridottasi

44. Għat-test għal antagonisti tal-androġe u inibituri ta' 5α-ridottasi, il-grupp ikkurat b'TP huwa l-kontroll negattiv, u l-grupp koamministrat bid-dożi ta' referenza tat-TP u l-FT huwa l-kontroll pożittiv. L-attività bijoloġika konsistenti ma' antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5α-ridottasi hija ttestjata billi tingħata doża ta' referenza ta' TP u bl-għoti tas-sustanza kimika tat-test għal 10 ijiem konsekuttivi. Il-piżijiet tal-ħames tessuti aċċessorji tas-sess mit-TP flimkien mal-gruppi tas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mal-grupp ta' referenza b'TP biss għal tnaqqisijiet statistikament sinifikanti fil-piżijiet.

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

45. Osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru tal-inqas darba kuljum u b'mod iktar spiss meta jkunu osservati sinjali ta' tossiċità. Idealment, l-osservazzjonijiet għandhom isiru fl-istess ħin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu tal-ogħla effetti antiċipati wara d-dożaġġ. L-annimali kollha għandhom jiġu osservati għall-mortalità, il-morbidità u sinjali kliniċi ġenerali bħal bidlet fl-imġiba, il-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukuża, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u l-attività awtonomika (eż. dmugħ, piloerezzjoni, daqs tal-ħabba, mudell respiratorju mhux tas-soltu).

46. Kwalunkwe annimal li jinstab mejjet għandu jitneħħa u jiġi dispost mingħajr analiżi ulterjuri tad-dejta. Kwalunkwe mortalità tal-annimali qabel in-nekropsija għandha tkun inkluża fir-reġistru tal-istudju ma' kwalunkwe raġuni apparenti għall-mortalità. Kwalunkwe annimal moribond għandu jinqatel b'mod dinjituż. Kwalunkwe annimal moribond li mbagħad jiġi ewtanizzat għandu jkun inkluż fir-reġistru tal-istudju bir-raġunijiet apparenti għall-morbidità.

▼M5

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel

47. L-annimali kollha għandhom jintiżnu kuljum sal-eqreb 0,1 g, b'bidu eżatt qabel ma tinbeda l-kura, jiġifieri meta -annimali jitqassmi fi gruppi. Bħala kejl fakultattiv, l-ammont ta' ikel ikkonsmat matul il-perjodu tal-kura jista' jitkejjel skont kull gaġġa billi jintiżnu dawk li jitgħalfu. Ir-riżultati tal-konsum tal-ikel għandhom jingħataw fi grammi għal kull far kull jum.

Dissezzjoni u kejl tal-piżijiet tat-tessuti u tal-organi

48. Madwar 24 siegħa wara l-aħħar għoti tas-sustanza kimika tat-test, il-firien għandhom jiġu ewtanizzati u żvinati skont il-proċeduri normali tal-kondotta fil-laboratorju, u għandha ssir in-nekropsija. Il-metodu ta' qtil dinjituż għandu jiġi rreġistrat fir-rapport tal-laboratorju.

49. Idealment, l-ordni ta' nekropsija għandha tkun aleatorja fost il-gruppi biex tiġi evitata progressjoni direttament 'il fuq jew 'l isfel ta' gruppi ta' doża li tista' taffettwa d-dejta. Kwalunkwe sejba fin-nekropsija, jiġifieri bidliet patoloġiċi/leżjonijiet viżibbli għandha titniżżel u tiġi rreġistrata.

50. Il-ħames tessuti li jiddependu fuq l-androġen (VP, SV, LABC, COW, GP) għandhom jintiżnu. Dawn it-tessuti għandhom jinqatgħu, jitraqqmu bi preċiżjoni mit-tessut u x-xaħam imqabbad żejjed, u għandhom jiġu determinati l-piżijiet friski (mhux fissati) tagħhom. Kull tessut għandu jitqandel b'attenzjoni partikolari biex jiġi evitat it-telf ta' fluwidi u biex tiġi evitata desikkazzjoni, li tista' tintroduċi żbalji importanti u varjabbiltà billi jitnaqqsu l-piżijiet irreġistrati. Ħafna mit-tessuti jistgħu jkunu żgħar ħafna jew diffiċili wisq biex issirilhom dissezzjoni, u dan ser jintroduċi varjabbiltà. Għalhekk, importanti li l-persuni li jagħmlu d-dissezzjoni tat-tessuti aċċessorji tas-sess ikunu midħla tal-proċeduri standard ta' dissezzjoni għal dawn it-tessuti. Manwal tal-proċedura standard tal-operazzjoni (SOP) għad-dissezzjoni huwa disponibbli mill-OECD (21). Taħriġ attent skont il-gwida dwar l-SOP ser inaqqas sors potenzjali ta' varjazzjoni fl-istudju. Idealment, l-istess prosettur għandu jkun responsabbli għad-dissezzjoni ta' tessut partikolari biex jiġu eliminati differenzi bejn individwi fl-ipproċessar tat-tessuti. Jekk dan ma jkunx possibbli, in-nekropsija għandha titfassal b'tali mod li kull prosettur jagħmel dissezzjoni ta' tessut partikolari mill-gruppi tal-kura kollha u mhux għal individwu wieħed li jagħmel dissezzjoni tat-tessuti kollha minn grupp ta' kontroll, filwaqt li ħaddieħor ikun responsabbli għall-grupp ikkurat. Kull tessut aċċessorju tas-sess għandu jintiżen mingħajr tnixxif sal-eqreb 0,1 mg, u l-piżijiet iridu jiġu rreġistrati għal kull annimali.

51. Ħafna mit-tessuti jistgħu jkunu żgħar ħafna jew diffiċili wisq biex issir dissezzjoni tagħhom, u dan ser jintroduċi varjabbiltà. Ħidma fl-imgħoddi indikat medda ta' koeffiċjent tal-varjazzjonijiet (CVs) li donnu jvarja fuq il-bażi tal-profiċjenza tal-laboratorju. Fi ftit każijiet, fi ħdan laboratorju partikolari ġew osservati differenzi kbar fil-piżijiet assoluti tat-tessuti bħall-VP u s-COWS.

52. Il-kejl ta' fwied, kilwa f'par u adrenali f'par huwa fakultattiv. Mill-ġdid, it-tessuti għandu jitneħħilhom kwalunkwe fascia u xaħam imqabbad magħhom. Il-fwied għandu jintiżen u jiġi rreġistrat sal-eqreb 0,1 g u l-kliewi f'par u l-adrenali f'par għandhom jintiżnu u jiġu rreġistrati sal-eqreb 0,1 mg. Il-fwied, il-kilwa u l-adrenali mhumiex influwenzati minn androġeni biss; jipprovdu wkoll ħjiliet utli ta' tossiċità sistemika.

▼M5

53. Il-kejl tal-ormon luteinizzanti tas-serum (LH), l-orom li jistimola l-follikoli (FSH) u t-testosteron (T) huwa fakultattiv. Il-livelli tas-serum T huma utli biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test tinduċix metaboliżmu tal-fwied ta' testosteron, li jbaxxi l-livelli tas-serum. Mingħajr id-dejta T, effett bħal dan jista' jidher li ġej minn mekkaniżmu antiandroġeniku. Il-livelli tal-LH jipprovdu informazzjoni dwar il-ħila ta' antiandroġenu sabiex mhux biss jonqsu l-piżijiet tal-organi, iżda anki sabiex tiġi affettwata l-funzjoni ipotalamika-pitwitarja, li fi studji fit-tul tista' tinduċi tumuri fit-testikoli. L-FSH huwa ormon importanti għall-ispermatoġenesi. Is-serum T4 u T3 huma kejl fakultattiv ukoll li jipprovdi informazzjoni supplimentari utli dwar il-ħila li tiġi interrotta omeostaži tal-orom tat-tirojde. Jekk ser isiru l-kejliet tal-oromon, il-firien għandhom jiġu anestetizzati qabel in-nekropsija u għandu jittieħed id-demm permezz ta' titqiba kardijaka, u l-metodu tal-anesteżija għandu jingħażel b'attenzjoni sabiex ma jaffettwax il-kejl tal-ormon. Il-metodu tat-tħejjija tas-serum, is-sors tar-radjuimmunoassaġġ jew kits oħrajn ta' kejl, il-proċeduri analitiċi, u r-riżultati għandhom jiġu rreġistrati. Il-livelli tal-LH għandhom jiġu rrapportati bħala ng għal kull ml serum, u l-livell ta' T għandu jiġi rrapportat ukoll bħala ng għal kull ml serum.

54. Id-dissezzjoni tat-tessuti hija deskritta kif ġej bi gwida dettaljata ta' dissezzjoni b'ritratti ppubblikati bħala materjali supplementari bħala parti mill-programm ta' validazzjoni (21). Hemm ukoll vidjo ta' dissezzjoni għad-dispożizzjoni mill-paġna fuq il-web tal-Korea Food and Drug Administration (22).

— Bil-wiċċ ventrali tal-annimal iħares 'il fuq, ara jekk il-prepuzju tal-pene isseparax mir-ras tal-pene. Jekk iva, imbagħad daħħal lura l-prepuzju u neħħi r-ras tal-pene, iżen (sal-eqreb 0,1 mg), u rreġistra l-piż,

— Iftaħ il-ġilda u l-ħajt tal-addome, biex tesponi l-vixxri. Jekk l-organi fakultattivi jintiżnu, neħħi u iżen il-fwied sal-eqreb 0,1 g, neħħi l-istonku u l-intestini u iżen il-kliewi f'par u l-adrenali f'par sal-eqreb 0,1 mg. Din id-dissezzjoni tesponi l-apparat tal-urina u tibda d-dissezzjoni tat-tessuti aċċessorji fil-mira tar-raġel,

— Biex tagħmel dissezzjoni tal-VP, issepara l-apparat tal-urina mis-saff tal-muskolu ventrali billi taqta' t-tessut konnettiv tul il-linja tan-nofs. Ċaqlaq l-apparat tal-urina lura lejn in-nuffati seminali (SV), biex tikxef il-lobi tax-xellug u tal-lemin tal-prostata ventrali (miksija b'saff xaħam). Bil-mod iġbed ix-xaħam mil-lobi tal-lemin u tax-xellug tal-VP. Bir-reqqa ċaqlaq il-lobu tal-lemin tal-VP mill-uretra u agħmel dissezzjoni tal-lobu mill-uretra. Filwatq li tibqa' żżomm il-lobu tal-lemin tal-VP, bil-mod ċaqlaq il-lobu tax-xellug tal-VP mill-uretra u mbagħad agħmel dissezzjoni; iżen sal-eqreb 0,1 mg u rreġistra l-piż,

— Biex tagħmel dissezzjoni tal-SVCG, ċaqlaq l-apparat tal-urina lejn id-denb, biex tesponi l-vas deferens u l-lobi tal-lemin u tax-xellug tan-nuffati seminali flimkien mal-glandoli koagulanti (SVCG). Evita tnixxija ta' fluwidu billi ssodd b'emostata fil-bażi tal-SVCGs, fejn il-vas deferens jingħaqad mal-uretra. Bil-mod agħmel dissezzjoni tal-SVCGs, bl-emostata f'postha neħħi x-xaħam u l-adnexa, qiegħed f'użin tat-tara, neħħi l-emostata, u iżen sal-eqreb 0,1 mg u rreġistra l-piż,

▼**M5**

— Biex tagħmel dissezzjoni tal-muskoli reffiegħa bulbokavernosi ani plus (LABC), il-muskoli u l-bażi tal-pene jiġu esposti. Il-muskoli LA jiksu l-kolon, filwaqt li l-muskoli anterjuri tal-LA u l-BC jaqbdu mal-basal tal-pene. Il-ġilda u l-adnexa mir-reġjuni perianali li jestendi mill-bażi tal-pene sat-tarf anterjuri tal-anus jitneħħew. Il-muskoli tal-BC jiġu dissezzjonati b'mod gradwali mill-basla u t-tessuti tal-pene. Il-kolon tinqata' fi tnejn u, l-LABC sħaħ jistgħu jiġu dissezzjonati u jitneħħew. L-LABC għandu jitneħħilhom ix-xaħam u l-adnexa, jintiżnu sal-eqreb 0,1 mg, u jiġi rreġistrat il-piż tagħhom,

— Wara li jitneħħew l-LABC, il-glandoli ttondjati ta' Cowper jew bulboretrali (COW) isiru viżibbli fil-bażi ta', u ftit dorsali għal, basal tal-pene. Hemm bżonn li ssir dissezzjoni bir-reqqa biex jiġi evitat milli tintlaqat il-kapsula rqiqa ħalli tiġi evitata tnixxija ta' fluwidi. Iżen is-COW f'par sal-eqreb 0,1 mg, u rreġistra l-piż,

— Barra minn hekk, jekk jintilef fluwidu minn xi glandola matul in-nekropsija u d-dissezzjoni, dan għandu jiġi rreġistrat.

55. Jekk l-evalwazzjoni ta' kull sustanza kimika tkun teħtieġ nekropsija ta' iktar annimali minn dak li huwa raġonevoli għal jum wieħed, il-bidu tal-istudju jista' jkun imxekkel għal jumejn konsekuttivi, u dan jirriżulta fix-xekkil tan-nekropsija u l-ħidma relatata għal jumejn. Jekk ikun hemm xekkil bħal dan, għandhom jintużaw nofs l-annimali għal kull grupp tal-kura kull jum.

56. Għandha ssir dispożizzjoni b'mod xieraq tal-karkassi wara n-nekropsija.

RAPPORTAR

Dejta

57. Id-dejta għandha tiġi rrapportata b'mod individwali (jiġifieri l-piż tal-ġisem, il-piżijiet tat-tessut aċċessorju tas-sesss, kejliet fakultattivi u risponsi u osservazzjonijiet oħrajn) u għal kull grupp ta' annimali (medji u devjazzjonijiet standard ta' kull kejl meħud). Id-dejta għandha tinġabar fil-qosor f'forma ta' tabella. Id-dejta għandha turi n-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjubin mejtin matul it-test jew misjubin li qed juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inklużi l-ħin tal-bidu, id-durata u s-severità.

58. Rapport finali għandu jinkludi:

Faċilità tal-ittestjar

— Isem il-faċilità, il-post,

— Id-direttur tal-istudju u persunal ieħor u r-responsabilitajiet ta' studju tiegħu,

— Id-dati li fihom beda u ntemm l-istudju, jiġifieri l-ewwel jum tal-għoti tas-sustanza kimika tat-test u l-aħħar jum ta' nekropsija, rispettivament.

Sustanza kimika tat-test

— Is-sors, in-numru tal-lott, l-identità, il-purità, l-indirizz sħiħ tal-fornitur u l-karatterizzazzjoni tas-sustanza/i kimika/kimiċi,

— L-għamla fiżika u, fejn rilevanti, il-proprjetajiet fiżjokimiċi,

— Il-kundizzjonijiet ta' ħżin u l-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tad-dilwizzjoni,

— Kwalunkwe dejta ġġenerata fuq l-istabbiltà,

— Kwalunkwe analiżi tas-soluzzjonijiet/sospensjonijiet tad-dożaġġ.

▼**M5**

Veikolu

— Il-karatterizzazzjoni tal-veikolu (identità, fornitur u Nru tal-lott),

— Ġustifikazzjoni tal-għażla tal-veikolu (jekk mhuwiex ilma).

Annimali tat-test u proċeduri ta' trobbija tal-annimali

— L-ispeċi/ir-razza użata u r-raġuni għall-għażla,

— Is-sors jew il-fornitur tal-annimali, inkluż l-indirizz sħiħ,

— In-numru u l-età tal-annimali forniti,

— Il-kundizzjonijiet fil-post tat-trobbija (temperatura, dawl, u l-bqija),

— Id-dieta (isem, tip, fornitur, numru tal-lott, kontenut u, jekk magħrufin, il-livelli ta' fitoestroġeni),

— Il-bejta (isem, tip, fornitur, kontenut),

— Il-kundizzjonijiet fil-gaġeġ u n-numru ta' annimali f'kull gaġġa.

Kundizzjonijiet tal-Assaġġ

— L-età tat-tiswija u d-durata tal-akklimatizzazzjoni wara t-tiswija,

— Il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tal-istudju (sal-eqreb 0,1 g),

— Il-proċess ta' tqassim aleatorju u rekord tal-assenjament għal veikolu, referenza, gruppi tas-sustanza kimika tat-test, u gaġeġ,

— Devjazzjoni medja u standard tal-piżijiet tal-ġisem għal kull grupp għal kull jum li jintiżnu fih tul l-istudju kollu,

— Ir-raġuni għall-għażla tad-doża,

— Ir-rotta tal-amministrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u r-raġuni għall-għażla tar-rotta ta' esponiment,

— Jekk assaġġ għall-antiandroġeniċità, it-trattament bit-TP (doża u volum),

— It-trattament bis-sustanza kimika tat-test (doża u volum),

— Il-ħin tad-dożaġġ,

— Il-proċeduri tan-nekropsija, inklużi mezzi ta' żvinar u kwalunkwe anestežija,

— Jekk isiru analiżijiet tas-serum, għandhom jiġu pprovduti dettalji dwar il-metodu. Pereżempju, jekk tintuża l-RIA, għandhom jiġu rrapportati l-proċedura tal-RIA, is-sors tal-kits tal-RIA, id-dati ta' skadenza tal-kits, il-proċedura għall-għadd tax-xintillar, u l-istandardizzazzjoni.

Riżultati

— L-osservazzjonijiet ta' kuljum għal kull annimal matul id-dożaġġ, inklużi:

— Il-piżijiet tal-ġisem (sal-eqreb 0.1 g),

— Is-sinjali kliniċi (jekk ikun hemm),

— Kwalunkwe kejl jew noti ta' konsum tal-ikel.

— L-osservazzjonijiet fin-nekropsija għal kull annimal, inklużi:

▼M5

— Id-data tan-nekropsija,

— Il-grupp tal-kura tal-annimali,

— L-ID tal-annimali,

— Il-prosettur,

— Il-ħin tal-ġurnata li fih isiru n-nekropsija u d-dissezzjoni,

— L-età tal-annimali,

— Il-piż tal-ġisem finali fin-nekropsija, filwaqt li jiġu osservati kwalunkwe żieda jew tnaqqis statistikament sinifikanti,

— L-ordni tal-iżvinar u d-dissezzjoni tal-annimali fin-nekropsija,

— Il-piżijiet tal-ħames tessuti fil-mira li jiddependu fuq l-androġen:

— Il-prostata ventrali (sal-eqreb 0,1 mg),

— In-nuffati seminali flimkien mal-glandoli koagulanti, inkluż fluwidu (f'pari, sal-eqreb 0,1 mg),

— Il-kumpless tal-muskolu reffiegħ bulbokavernosu ani plus (sal-eqreb 0.1 mg),

— Il-glandoli ta' Cowper (piż frisk — f'pari, sal-eqreb 0,1 mg),

— Ir-ras tal-pene (piż frisk sal-eqreb 0,1 mg);

— Il-piżijiet tat-tessuti fakultattivi, jekk isiru:

— Il-fwied (sal-eqreb 0,1 g),

— Il-kilwa (f'pari, sal-eqreb 0,1 mg),

— Adrenali (f'pari, sal-eqreb 0,1 mg);

— Rimarki u kummenti ġenerali,

— Analiżijiet tal-ormoni tas-serum, jekk isiru.

  — Serum LH (fakultattiv — ng għal kull ml serum), u

  — Serum T (fakultattiv — ng għal kull ml serum);

— Rimarki u kummenti ġenerali.

Sommarju tad-dejta

Id-dejta għandha tinġabar f'sommarju f'forma ta' tabella li jkun fiha d-daqs tal-kampjun għal kull grupp, il-medja tal-valur, u l-iżball standard tad-devjazzjoni medja jew standard. It-tabelli għandhom jinkludu piżijiet tal-ġisem fin-nekropsija, il-bidliet fil-piż tal-ġisem mill-bidu tad-dożaġġ san-nekropsija, il-piżijiet tat-tessuti aċċessorji tas-sess fil-mira, u kwalunkwe piż fakultattiv ta' organi.

Diskussjoni tar-riżultati

Analiżi tar-riżultati

59. Il-piżijiet tal-ġisem u l-organi fin-nekropsija għandhom jiġu analizzati b'mod statistiku għal karatteristiċi bħall-omoġenità tal-varjanza bi trasformazzjonijiet xierqa tad-dejta kif ikun hemm bżonn. Il-gruppi tal-kura għandhom jitqabblu ma' grupp ta' kontroll billi jintużaw tekniki bħal ANOVA segwiti minn tqabbil bejn pari (eż. it-test 'one tailed' ta' Dunnett) u l-kriterju għad-differenza statistika, pereżempju, $p \leq 0,05$. Dawk il-gruppi li jiksbu importanza statistika għandhom jiġu identifikati. Madankollu, piżijiet ta' "organi relattivi" għandhom jiġu evitati minħabba s-suppożizzjonijiet statistiċi invalidi li jinsabu fil-qalba ta' din il-manipulazzjoni tad-dejta.

▼**M5**

60. Għall-agoniżmu tal-androġen, il-kontroll għandu jkun il-grupp tat-test b'veikolu biss. Il-karatteristiċi tal-mod ta' azzjoni ta' sustanza kimika tat-test jistgħu jwasslu għal risponsi relattivi differenti bejn it-tessuti, pereżempju trenbolon, li ma jistgħux ikunu 5 alfa-ridotti, għandu effetti li jinħassu iktar fuq l-LABC u l-GP meta mqabbel mat-TP. Żieda statistikament importanti ($p \leq 0,05$) fi kwalunkwe tnejn jew iktar mill-ħames piżijiet tat-tessuti fil-mira li jiddependu fuq androġen (VP, LABC, GP, CG u SVCG) għandha titqies riżultat ta' agonist tal-androġen pożittiv, u t-tessuti kollha fil-mira għandhom juru xi graad ta' tkabbir miżjud. Evalwazzjoni kombinata tar-risponsi tat-tessuti tal-organi sesswali aċċessorji kollha (ASO) tista' tinkiseb billi ssir analiżi xierqa tad-dejta plurivarjata. Din tista' ttejjeb l-analiżi, speċjalment f'każijiet fejn tessut wieħed biss jagħti rispons statistikament importanti.

61. Għall-antagoniżmu tal-androġen, il-kontroll għandu jkun il-grupp tat-test tal-androġen ta' referenza (testosteron propjonat biss). Il-karatteristiċi tal-mod ta' azzjoni ta' sustanza kimika tat-test jistgħu jwasslu għal risponsi relattivi differenti bejn it-tessuti, pereżempju inibituri ta' 5 alfa α-ridottasi, bħal finasterid, għandhom effetti li jinħassu iktar fuq il-prostata ventrali milli tessuti oħrajn meta mqabblin ma' antagonisti qawwijin tal-AR, bħal flutamid. Tnaqqis statistikament importanti ($p \leq 0,05$) fi kwalunkwe tnejn jew iktar mill-ħames piżijiet tat-tessuti fil-mira li jiddependu fuq l-androġen (VP, LABC, GP, CG u SVCG) relatat mat-trattament bit-TP waħdu għandu jitqies bħala riżultat tal-antagonist tal-androġen pożittiv u t-tessuti kollha fil-mira għandhom juru xi grad ta' tkabbir imnaqqas. L-evalwazzjoni kombinata tar-risponsi kollha tat-tessut għall-ASO jistgħu jiġu arkivjati billi tintuża analiżi xierqa tad-dejta plurivarjata. Din tista' ttejjeb l-analiżi, speċjalment f'każijiet fejn tessut wieħed biss jagħti rispons statistikament importanti.

62. Id-dejta għandha tinġabar fil-qosor f'forma ta' tabella li jkun fiha l-medja, l-iżball standard tal-medja (devjazzjoni standard tkun aċċettabbli wkoll) u d-daqs tal-kampjun għal kull grupp. It-tabelli ta' dejta individwali għandhom ikunu inklużi wkoll. Il-valuri individwali, il-medja, il-valuri ta' SE (SD) u CV għad-dejta tal-kontroll għandhom jiġu eżaminati biex jiġi determinat jekk jilħqux kriterji aċċettabbli għal konsistenza ma' valuri storiċi mistennijin. CVs li jaqbżu l-valuri tas-CV elenkati fit-Tabella 1 (ara l-paragrafi 25 u 26) għal kull piż tal-organu għandhom jiddeterminaw jekk hemmx żbalji fir-reġistrazzjoni jew it-tidħil tad-dejta jew jekk il-laboratorju għadux laħaq livell eċċezzjonali ta' dissezzjoni preċiża tat-tessuti li jiddependu fuq l-androġen u jekk hemmx bżonn ta' iktar taħriġ/prattika. Ġeneralment, CVs (id-devjazzjoni standard maqsuma bil-piż medju tal-organi) huma riproduċibbli minn laboratorju għal ieħor u minn studju għal ieħor. Id-dejta ppreżentata għandha tinkludi tal-inqas: il-piżijiet tal-prostata ventrali, in-nuffata seminali, il-muskolu reffiegħ bulbukavernosu ani plus, il-glandoli ta' Cowper, ir-ras tal-pene, il-fwied u l-ġisem u l-bidla fil-piż tal-ġisem mill-bidu tad-dożaġġ san-nekropsija. Id-dejta tista' tiġi ppreżentata wkoll wara aġġustament tal-kovarjanza għall-piż tal-ġisem, iżda din ma għandhiex tieħu post preżentazzjoni tad-dejta mhux aġġustata. Barra minn hekk, jekk fl-ebda wieħed mill-gruppi ma sseħħ separazzjoni prepuzjali (PPS), l-inċidenza tal-PPS għandha tiġi rreġistrata u titqabbel b'mod statistiku mal-grupp tal-kontroll permezz tat-test Fisher Exact.

▼**M5**

63. Fil-verifika tad-dejta mdaħħla fil-kompjuter mal-iskedi tad-dejta oriġinali għall-preċiżjoni, il-valuri tal-piż tal-organi li mhumiex bijoloġikament plawżibbli jew li jvarjaw b'iktar minn tliet devjazzjonijiet standard mill-medji tal-grupp tat-trattament għandhom jiġu skrutinizzati bir-reqqa u jaf ikollhom bżonn jitwarrbu, peress li aktarx ikunu żbalji fir-reġistrazzjoni.

64. It-tqabbil tar-riżultati tal-istudju mal-valuri tas-CV tal-OECD (fit-Tabella 1) spiss ikun pass importanti fl-interpretazzjoni dwar il-validità tar-riżultati tal-istudju. Id-dejta storika għall-gruppi tal-kontroll tal-veikolu għandha tinżamm fil-laboratorju. Id-dejta storika għar-risponsi għal sustanzi kimiċi ta' referenza pożittivi, bħal TP u FT, għandha tinżamm fil-laboratorju wkoll. Il-laboratorju jistgħu jittestjaw b'mod perjodiku wkoll ir-rispons għal agonisti u antagonisti dgħajfin magħrufin tal-androġen u jżommu din id-dejta. Din id-dejta tista' titqabbel mad-dejta disponibbli tal-OECD biex jiġi żgurat li l-metodi tal-laboratorju jrendu preċiżjoni u saħħa statistiċi suffiċjenti.

▼**M5**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET:

Androġenika hija terminu użat biex tiġi deskritta influwenza pożittiva fuq it-tkabbir tat-tessuti li jiddependu fuq l-androġen

Antiandroġenika hija l-ħila ta' sustanza kimika sabiex trażżan l-azzjoni ta' TP f'organiżmu mammiferu.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Data tat-twelid hija l-jum 0 wara t-twelid.

Doża hija l-ammont ta' sustanza kimika mogħtija. Għall-Bijoassaġġ Hershberger, id-doża tingħata bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull piż tal-ġisem ta' unità tal-annimal tat-test f'kull jum (eż. mg/kg piż tal-ġisem/jum).

Dożaġġ hija terminu ġenerali li tinvolvi d-doża, il-frekwenza tagħha u d-durata tad-dożaġġ.

Moribond hija terminu użata biex tiddeskrivi annimal fi stat riesaq lejn il-mewt, jiġifieri qrib il-punt tal-mewt.

Jum X wara t-twelid huwa l-jum numru X tal-ħajja wara t-twelid.

Sensitività hija l-ħila ta' metodu ta' ttestjar biex jidentifika b'mod korrett sustanzi kimiċi li għandhom il-proprjetà li qed jiġu ttestjati għaliha.

Speċifiċità hija l-ħila ta' metodu ta' ttestjar biex jidentifika b'mod korrett sustanzi kimiċi li ma għandhomx il-proprjetà li qed jiġu ttestjati għaliha.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

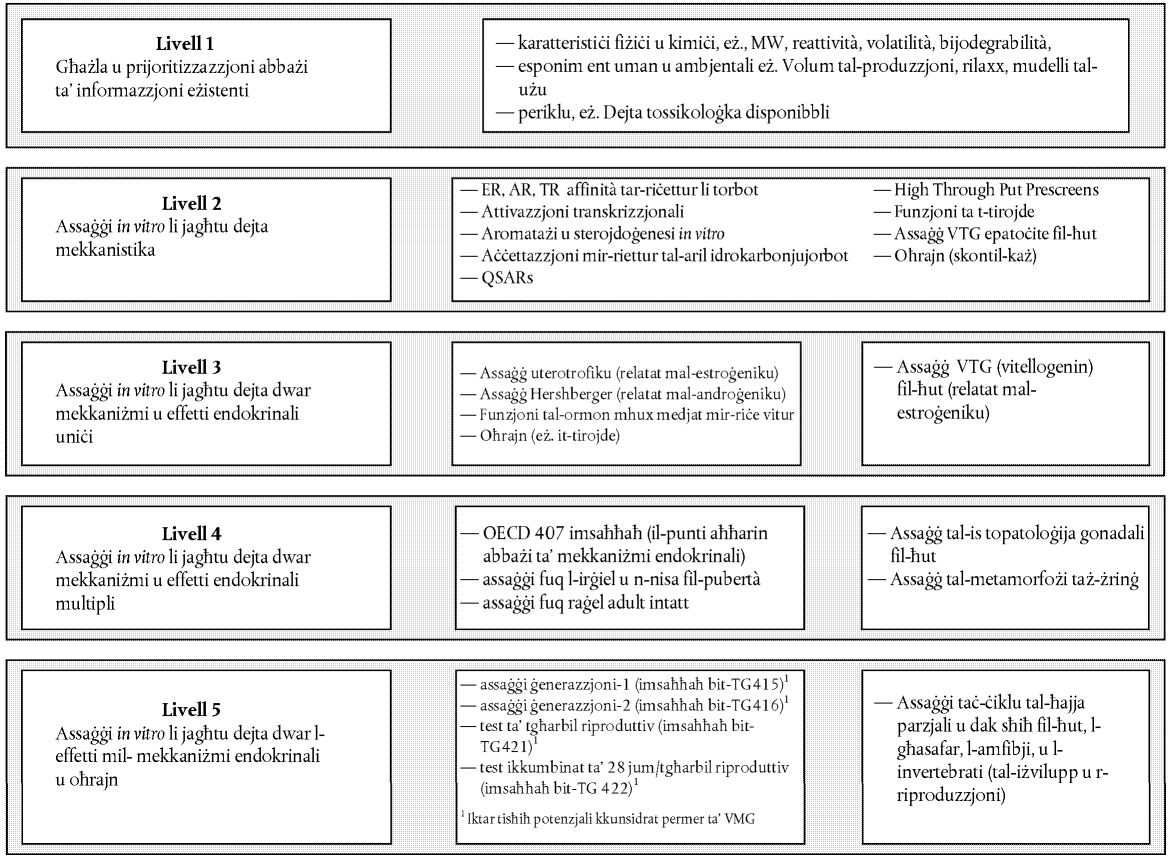
Validazzjoni hija proċess xjentifiku mfassal biex jiġu karatterizzati r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex tintwera l-affidabilità u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

▼M5

Appendiċi 2

Nota: Dokument imħejjimis Segretarjat tal-Programm tal-Lingji Gwida għat-T estijiet abbażi tal-ftehim milħuq fit-Sitt Laqgħa tat-TaskForce tal-EDTA

Il-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi li Jfixklu s-Sistema Endokrinali



VMG mamm: Grupp ta' Mmaniġġjar tal-Validazzjoni fuq Ittestjar u Valutazzjoni tal-Mammiferi

02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

NOTI GĦALL-QAFAS

Nota 1: Dħul fil-livelli kollha u ħruġ fil-livelli kollha huma possibbli u jiddependu fuq l-għamla tal-ħtiġijiet eżistenti ta' informazzjoni għal skopijiet ta' valutazzjoni tal-periklu u r-riskju.

Nota 2: Fil-livell 5, l-ekotossikoloġija għandha tinkludi punti aħħarin li jindikaw mekkaniżmi ta' effetti avversi, u l-ħsara potenzjali għall-popolazzjoni.

Nota 3: Meta mudell multimodali jkopri diversi mill-assaġġi tal-punt aħħari uniku, dak il-mudell jieħu post l-użu ta' dawk l-assaġġi tal-punt aħħari uniku.

Nota 4: Il-valutazzjoni ta' kull sustanza kimika għandha tkun imsejsa fuq bażi ta' każ b'każ, filwaqt li tittieħed f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni, filwaqt li tibqa' mfakkra l-funzjoni tal-livelli tal-qafas.

Nota 5: Il-qafas ma għandux jitqies li jinkludi kollox bħalissa. Fil-livelli 3, 4 u 5 jinkludi assaġġi li jew huma disponibbli jew inkella li għalihom qed issir validazzjoni. Fir-rigward ta' dawn tal-aħħar, dawn huma inklużi b'mod provviżorju. Ladarba jiġu żviluppati u vvalidati, dawn ser jiżdiedu b'mod formali mal-qafas.

Nota 6: Il-livell 5 ma għandux jitqies li jinkludi testijiet definittivi biss. It-testijiet inklużi f'dak il-livell jitqiesu li jikkontribwixxu għall-valutazzjoni ġenerali tal-perikli u r-riskji.

TAGĦRIF

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 ta' Marzu 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

▼M5

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

(9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413-422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306-1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

(16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p. 38.

(17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Pariġi.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. Ara, t-taqsima II, Il-gwida dwar id-dissezzjoni pprovduta lil-laboratorji: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

(22) Korea Food and Drug Administration. Gwida b'referenza viżwali dwar il-proċedura ta' assaġġ Hershberger, inkluż filmat ta' dissezzjoni. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) Id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

(27) Il-kapitoli li ġejjin ta' dan l-Anness:

B.1 bis, Tossiċità orali akuta — proċedura b'doża fissa

B.1 tris, Tossiċità orali akuta — metodu tal-klassi tossika akuta

▼M5

B.56 **STUDJU ESTIŻ TAT-TOSSIĊITÀ RIPRODUTTIVA TA' ĠENERAZZJONI WAĦDA**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Testijiet (TG) tal-OECD Nru 443 (2012). Huwa bbażat fuq il-proposta tal-Kumitat Tekniku tal- International Life Science Institute (ILSI)-Health and Environmental Sciences Institute (HESI), Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) għal studju estiż dwar ir-riproduttività ta' ġenerazzjoni waħda fl-istadju tal-ħajja F_1 kif ippubblikata f'Cooper et al., 2006 (1). Sar ħafna titjib u kien hemm ħafna kjarifiki fit-tifsila tal-istudju sabiex tiġi pprovduta flessibilità u sabiex tiġi enfasizzata l-importanza tal-bidu b'għarfien eżistenti, filwaqt li jintużaw osservazzjonijiet tul il-ħajja biex jiġi ggwidat u jitfassal l-ittestjar. Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi deskrizzjoni dettaljata tal-kondotta operazzjonali ta' Studju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda. Il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi tliet koorti ta' annimali F_1:

Koorta 1:: valutazzjoni tal-punti aħħarin tar-riproduzzjoni/l-iżvilupp; din il-koorta tista' tiġi estiża biex tinkludi ġenerazzjoni F_2,

Koorta 2:: valutazzjoni tal-impatt potenzjali tal-esponiment kimiku fuq is-sistema nervuża li tkun fil-proċess ta' żvilupp,

Koorta 3:: valutazzjoni tal-impatt potenzjali tal-esponiment kimiku fuq is-sistema immuni li tkun fil-proċess ta' żvilupp.

2. Deċiżonijiet dwar jekk tiġix ivvalutata t-tieni ġenerazzjoni u biex titneħħa koorta tan-newrotossiċità tal-iżvilupp u/jew koorta tal-immunotossiċità tal-iżvilupp għandhom jirriflettu għarfien eżistenti għas-sustanza kimika li tkun qed tiġi evalwata, kif ukoll il-bżonnijiet tal-bosta awtoritajiet regolatorji. L-iskop tal-metodu ta' ttestjar huwa li jipprovdi dettalji dwar kif jista' jsir l-istudju u li jindirizza kif għandha tiġi evalwata kull koorta.

3. Il-proċedura għad-deċiżjoni dwar l-iskattar intern għall-produzzjoni tat-tieni ġenerazzjoni hija deskritta fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 117 (39) għal dawk l-awtoritajiet regolatorji li jużaw skattaturi interni.

KUNSIDERAZZJONIJIET U GĦANIJIET INIZJALI

4. L-għan ewlieni tal-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda huwa li jevalwa l-istadji tal-ħajja speċifiċi mhux koperti minn tipi oħrajn ta' studji tat-tossiċità u jittestja għal effetti li jistgħu jseħħu minħabba esponiment kimiku qabel u wara t-twelid. Għal punti aħħarin riproduttivi, huwa previst li, bħala l-ewwel pass u meta tkun disponibbli, tintuża informazzjoni minn studji b'doża ripetuta (inklużi studji ta' tgħarbil dwar it-tossiċità riproduttiva, eż., TG tal-OECD Nru 422 (32)), jew assaġġi ta' tgħarbil ta' interferenti endokrinali fuq terminu qasir, (eż., Assaġġ uterotrofiku — metodu ta' ttestjar B.54 (36); u l-assaġġ Hershberger — metodu ta' ttestjar B.55 (37)) biex jinqabdu effetti fuq organi riproduttivi għall-irġiel u n-nisa. Dan jista' jinkludi spermatoġenesi (istopatoloġija testikolari) għall-irġiel u ċikli estrużi, għadd tal-follikoli/maturità tal-ooċiti u integrità tal-ovarji (istopatoloġija) għan-nisa. Imbagħad, l-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda jservi bħala test għal punti aħħarin riproduttivi li jeħtieġu l-interazzjoni ta' rġiel ma' nisa, nisa ma' conceptus, u nisa ma' ulied u l-ġenerazzjoni F_1 generation sa wara l-maturità sesswali (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151 li jsostni dan il-metodu ta' ttestjar (40)).

▼**M5**

5. Il-metodu ta' ttestjar huwa mfassal sabiex jipprovdi evalwazzjoni tal-effetti ta' qabel u wara t-twelid tas-sustanzi kimiċi fuq l-iżvilupp kif ukoll evalwazzjoni dettaljata tat-tossiċità sistemika f'nisa tqal u li qed ireddgħu u wlied żgħar u adulti. Analiżi dettaljata tal-punti aħħarin ewlenin tal-iżvilupp, bħall-vijabbiltà tal-wild, is-saħħa ta' dawk li għadhom kif jitwieldu, l-istatus tal-iżvilupp fit-twelid, u l-iżvilupp fiżiku u funzjonali sal-adultezza, hija mistennija tidentifika organi speċifiċi fil-mira fl-ulied. Barra minn hekk, l-istudju ser jipprovdi u/jew jikkonferma informazzjoni dwar l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq l-integrità u l-prestazzjoni tas-sistemi riproduttivi ta' rġiel u nisa adulti. B'mod speċifiku, iżda mhux biss, jiġu kkunsidrati l-parametri li ġejjin: il-funzjoni gonadali, iċ-ċiklu estruż, il-maturità tal-isperma epdidimali, l-imġiba tat-tgħammir, it-twelid, it-tqala, il-ħlas, u t-treddigħ. Barra minn hekk, l-informazzjoni miksuba mill-valutazzjonijiet tan-newrotossiċità tal-iżvilupp u tal-immunotossiċità tal-iżvilupp ser tikkaratterizza l-effetti potenzjali f'dawk is-sistemi. Id-dejta miksuba minn dawn it-testijiet għandha tippermetti li ssir id-determinazzjoni tal-Livelli ta' Effett Avvers Mhux Osservat (NOAELs), l-Inqas Livelli ta' Effett Avvers Osservat (LOAELs) u/jew dożi ta' riferiment għall-bosta punti aħħarin u/jew tintuża biex tikkaratterizza l-effetti misjubin fi studji preċedenti b'doża ripetuta u/jew isservi ta' gwida għat-testijiet sussegwenti.

6. Fil-Figura 1 hemm ippreżentata tpinġija skematika tal-protokoll. Is-sustanza kimika tat-test tingħata kontinwament f'dożi gradwati lil bosta gruppi ta' rġiel u nisa sesswalment maturi. Din il-ġenerazzjoni parentali (P) hija dożata għal perjodu definit qabel it-tgħammir (magħżul fuq il-bażi tal-informazzjoni disponibbli tas-sustanza kimika tat-test; iżda għal tal-inqas ġimgħatejn) u perjodu ta' tgħammir ta' ġimgħatejn. Irġiel P ikomplu jiġu kkurati tal-inqas sal-ftim tal-F_1. Għandhom jiġu kkurati għal tal-inqas 10 ġimgħat. Jistgħu jiġu kkurati iktar jekk ikun hemm bżonn li jiġu ċċarati l-effetti fuq ir-riproduzzjoni. Il-kura tan-nisa P tkompli matul it-tqala u t-treddigħ sat-terminazzjoni wara l-ftim tal-boton tagħhom (jiġifieri 8-10 ġimgħat ta' kura). L-ulied F_1 jirċievu iktar kura bis-sustanza kimika tat-test mill-ftim sal-adultezza. Jekk tiġi vvalutata t-tieni ġenerazzjoni (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 117 (39)), l-ulied F_1 ser jinżammu bil-kura sal-ftim tal-F_2, jew sa tmiem l-istudju.

7. Osservazzjonijiet kliniċi u eżamijiet patoloġiċi jsiru fuq l-annimali kollha għal sinjali ta' tossiċità, b'enfasi speċjali fuq l-integrità u l-prestazzjoni tas-sistemi riproduttivi ta' rġiel u nisa u s-saħħa, it-tkabbir, l-iżvilupp u l-funzjoni tal-ulied. Fil-ftim, l-ulied magħżulin jiġu assenjati f'sottogruppi speċifiċi (koorti 1-3, ara l-paragrafi 33 u 34 u l-Figura 1) għal iktar investigazzjonijiet, inklużi l-maturità sesswali, l-integrità u l-funzjoni tal-organu riproduttiv, il-punti aħħarin newroloġiċi u tal-imġiba, u l-funzjonijiet immuni.

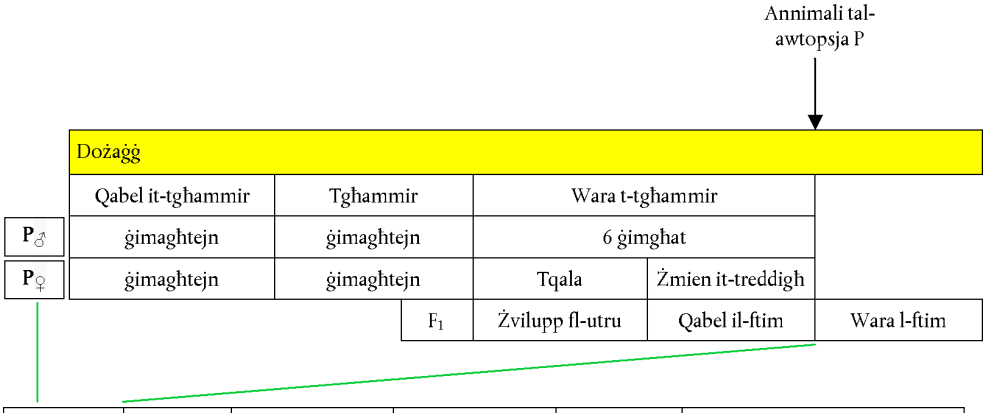
8. Fit-twettiq tal-istudju, għandhom jiġu segwiti l-prinċipji ta' gwida u l-kunsiderazzjonijiet spjegati fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 19 dwar ir-rikonoxximent, il-valutazzjoni, u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti aħħarin umanitarji għal annimali sperimentali użati fl-evalwazzjonijiet tas-sikurezza (34).

▼M5

9. Meta jkun hemm disponibbli numru suffiċjenti ta' studji biex ikun żgurat l-impatt ta' din it-tifsila l-ġdida tal-istudju, il-metodu ta' ttestjar ser jiġi analizzat u jekk ikun hemm bżonn rivedut fid-dawl tal-esperjenzi miksubin.

Figura 1

Skema tal-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda



Ġenerazzjoni tal-ġenituri	Koorti	Dożinjazzjoni	Annimali/koorti	Maturazzjoni sesswali	L-età approssimattiva fl-awtopsja (ġimgħat)
Il-mira hi 20 fertil kull grupp	1A	Riproduttiva	20 R + 20 M	Iva	13
	1B	Riproduttiva	20 R + 20 M	Iva	14 jew 20-25 jekk jiġu skattati
	2A	Newrotossiċità	10 R + 10 M@	Iva	11-12
	2B	Newrotossiċità	10 R + 10 M@	Le	3
	3	Immunotossiċità	10 R + 10 M@	Iva	8
	Żjieda	Ta' riżerva		Le	3

@ wieħed għal kull fertil u li jirrappreżenta 20 fertil bħala total, meta possibbli

DESKRIZZJONIJIET TAL-METODU/PREPARAZZJONIJIET GĦAT-TEST

Annimali

Għażla tal-ispeċi u r-razza tal-annimali

10. L-għażla tal-ispeċi għat-test tat-tossiċità riproduttiva għandha tiġi kkunsidrata bir-reqqa fid-dawl tal-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni. Madankollu, minħabba d-dejta ta' sfond estensiva u l-komparabbiltà għat-testijiet tat-tossiċità ġenerali, normalment il-far ikun l-ispeċi preferuta, u l-kriterji u r-rakkomandazzjonijiet mogħtijin f'dan il-metodu ta' ttestjar jirreferu għal din l-ispeċi. Jekk jintużaw speċi oħrajn, għandha tingħata ġustifikazzjoni u ser ikun hemm bżonn li jsiru l-modifiki xierqa. Ma għandhomx jintużaw razez b'fekondità baxxa jew inċidenza għolja magħrufa sew ta' difetti spontanji fl-iżvilupp.

L-età, il-piż tal-ġisem u l-kriterji ta' inklużjoni

11. Għandhom jintużaw annimali parentali b'saħħithom li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali fl-imgħoddi. Kemm l-irġiel kif ukoll in-nisa għandhom ikunu studjati u n-nisa għandhom ikunu qatt ma welldu u mhux tqal. L-annimali P għandhom ikunu laħqu l-maturità sesswali, ta' piż simili (dawk tal-istess sess) fil-bidu tad-dożaġġ, età simili (madwar 90 jum) fit-tgħammir, u jirrappreżentaw l-ispeċi u r-razza fl-istudju. L-annimali għandhom jiġu akklimatizzati għal tal-inqas 5 ijiem wara li jaslu. L-annimali jitqassmu b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u kura, b'tali mod li jirriżultaw f'valuri medji komparabbli tal-piż tal-ġisem bejn il-gruppi (jiġifieri ± 20 % tal-medja).

▼**M5**

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-għalf

12. It-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperiment għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). L-umdità relattiva għandha tkun bejn 30-70 %, b'medda ideali ta' 50–60 %. Id-dawl artifiċjali għandu jitfassal għal 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista illimitata ta' ilma tajjeb għax-xorb. Għandha tingħata attenzjoni bir-reqqa għall-kontenut ta' fitoestroġen tad-dieta, peress li livell għoli ta' fitoestroġen fid-dieta jista' jaffettwa xi punti aħħarin tar-riproduzzjoni. Huma rakkomandati dieti standaradizzati b'formula miftuħa li fihom tnaqqsu s-sustanzi kimiċi estroġeniċi (2)(30). L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata b'dan il-metodu. Il-kontenut, l-omoġenità u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fid-dieti għandhom jiġu verifikati. L-għalf u l-ilma tajjeb għax-xorb għandhom jiġu analizzati b'mod regolari għal kontaminanti. Il-kampjuni ta' kull lott tad-dieta użata matul l-istudju għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet xierqa (eż., iffriżati f'– 20 °C), sakemm jiġi finalizzat ir-rapport, f'każ li r-riżultati jeħtieġu iktar analiżi tal-ingredjenti tad-dieta.

13. L-annimali għandhom jitqiegħdu f'gaġeġ fi gruppi żgħar tal-istess sess u grupp tal-kura. Jistgħu jitqiegħdu f'gaġġa b'mod individwali biex jiġu evitati korrimenti possibbli (eż., irġiel wara l-perjodu ta' tgħammir). Il-proċeduri ta' tgħammir għandhom isiru f'gaġeġ xierqa. Wara evidenza ta' kopulazzjoni, in-nisa li huma supponuti tqal jitqiegħdu f'gaġeġ separati għall-ħlas jew il-maternità fejn ikunu pprovduti b'materjali xierqa u definiti tat-tibjit. Il-boton jitqiegħdu ma' ommhom sal-ftim. Annimali F_1 għandhom jitqiegħdu fi gruppi żgħar tal-istess sess u grupp tal-kura mill-ftim sat-tmiem. Jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat, l-annimali jistgħu jitqiegħdu f'gaġġa b'mod individawli. Il-livell ta' fitoestroġeni li jinsab fil-materjal tat-tibjit magħżul għandu jkun minimu =.

Numru u identifikazzjoni tal-annimali

14. Is-soltu, kull test u grupp ta' kontroll għandu jkun fih numru suffiċjenti ta' pari tat-tgħammir biex tal-inqas ikun hemm 20 mara tqila f'kull grupp tad-doża. L-għan huwa li jiġu prodotti biżżejjed nisa tqal ħalli tkun żgurata evalwazzjoni valida tal-potenzjal tas-sustanza kimika sabiex taffettwa l-fertilità, it-tqala u l-imġiba materna tal-ġenerazzjoni P u t-tkabbir u l-iżvilupp tal-ulied F_1, mit-twelid sal-maturità. Nuqqas ta' kisba tan-numru mixtieq ta' annimali tqal mhux bilfors jinvalida l-istudju u għandu jiġi evalwat fuq bażi ta' każ b'każ, filwaqt li tiġi kkunsidrata relazzjoni kawżali possibbli mas-sustanza kimika tat-test.

15. Kull annimal P jiġi assenjat numru uniku ta' identifikazzjoni qabel jibda d-dożaġġ. Jekk id-dejta storika tal-laboratorju tissuġġerixxi li sehem importanti ta' nisa jistgħu ma jurux ċikli estruži regolari (4 jew 5 ijiem), huwa rakkomandat li ssir valutazzjoni taċ-ċikli estruži qabel tibda l-kura. Inkella, id-daqs tal-grupp jista' jiżdied biex jiġi żgurat li tal-inqas 20 mara f'kull grupp ikollha ċikli estruži regolari (4 jew 5 ijiem) fil-bidu tal-kura. L-ulied F_1 kollha jiġu identifikati b'mod uniku meta jiġu eżaminati għall-ewwel darba dawk li jkunu għadhom kif twieldu fil-jum ta' wara t-twelid (PND) 0 jew 1. Ir-reġistrazzjonijiet li jindikaw il-boton ta' oriġini għandhom jinżammu għall-annimali F_1, u F_2 kollha fejn applikabbli, matul l-istudju kollu.

▼M5

Is-sustanza kimika tat-test

L-informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza kimika tat-test

16. L-analiżi tal-informazzjoni eżistenti hija importanti għal deċiżjonijiet dwar ir-rotta tal-amministrazzjoni, l-għażla tal-veikolu, l-għażla tal-ispeċi tal-annimali, l-għażla tad-dożaġġi u l-modifiki potenzjali tal-iskeda tad-dożaġġ. Għaldaqstant, l-informazzjoni kollha li hemm għad-dispożizzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test, jiġifieri proprjetajiet fiżikokimiċi, tossikokinetiċi (inkluż metaboliżmu speċifiku għall-ispeċi), tossikodinamiċi, relazzjonijiet bejn l-istruttura u l-attività (SARs), proċessi metaboliċi *in vitro*, riżultati ta' studji preċedenti dwar it-tossiċità u informazzjoni rilevanti dwar analogi strutturali għandhom jittieħdu f'kunsiderazzjoni fl-ippjanar tal-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda. Informazzjoni preliminari dwar l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu u l-eliminazzjoni (ADME) u l-bijoakkumulazzjoni tista' tinkiseb mill-istruttura kimika, id-dejta fiżikokimika, il-firxa ta' proteina tal-plażma li tgħaqqad jew studji tossikokinetiċi (TK), filwaqt li r-riżultati minn studji tat-tossiċità jagħtu informazzjoni addizzjonali, eż., dwar in-NOAEL, il-metaboliżmu jew l-induzzjoni tal-metaboliżmu.

Kunsiderazzjoni tad-dejta tossikokinetika

17. Għad li mhijiex meħtieġa, dejta dwar it-TK minn studji li saru fl-imgħotti ta' sejbien tal-medda tad-doża jew oħrajn huma ferm utli fl-ippjanar tat-tifsila tal-istudju, l-għażla tal-livelli tad-doża u l-interpretazzjoni tar-riżultati. Hija partikolarment utli dejta li: 1) tivverifika l-esponiment ta' feti u frieħ li qed jiżviluppaw għas-sustanza kimika tat-test (jew metaboliti rilevanti), 2) tipprovdi stima tad-dożimentrija interna, u 3) tevalwa għal saturazzjoni potenzjali li tiddependi fuq id-doża tal-proċessi kinetiċi. Dejta addizzjonali dwar it-TK, bħal profili tal-metaboliti, korsijiet tal-ħin ta' konċentrazzjoni, eċċ. għandha tiġi kkunsidrata wkoll jekk tkun disponibbli. Dejta supplimentari dwar it-TK tista' tinġabar ukoll matul l-istudju ewlieni, diment li ma xxekkilx il-ġbir u l-interpretazzjoni tal-punti aħħarin ewlenin tal-istudju.

Bħala gwida ġenerali, is-sett ta' dejta li ġej dwar it-TK ikun utli fl-ippjanar tal-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda:

— Tqala tard (eż., Jum tat-Tqala 20) — demm matern u demm tal-fetu,

— Nofs it-treddigħ (PND 10) — demm matern, demm tal-fertilità u/jew ħalib,

— Ftit wara l-ftim (eż., PND 28) — kampjuni tad-demm tal-annimal li nfatam.

Għandu jkun hemm flessibbiltà fid-determinazzjoni tal-analiti speċifiċi (eż. sustanza kimika u/jew metaboliti tal-ġenitur) u l-iskema tal-kampjunar. Pereżempju, in-numru u l-puntwalità tal-ġbir tal-kampjun f'jum partikolari tal-kampjunar ser ikunu jiddependu fuq ir-rotta ta' esponiment u l-għarfien minn qabel dwar il-proprjetajiet tat-TK f'annimali mhux tqal. Għal studji djetetiċi, il-kampjunar f'ħin konsistenti wieħed f'kull wieħed minn dawn il-jiem huwa biżżejjed, filwaqt li d-dożaġġ b'gavage jista' jkun jeħtieġ ħinijiet traddizzjonali ta' kampjunar biex tinkiseb stima aħjar tal-medda ta' doži interni. Madankollu, m'hemmx bżonn li jiġi ġġenerat perjodu ta' żmien b'konċentrazzjoni sħiħa f'xi wieħed mill-jiem tal-kampjun. Jekk ikun hemm bżonn, id-demm jista' jinġabar skont is-sess fi ħdan il-boton għal analiżijiet tal-fetu u tal-annimali li għadhom kif twieldu.

▼M5

Rotta tal-amministrazzjoni

18. L-għażla tar-rotta għandha tieħu f'kunsiderazzjoni l-iktar rotta/rotot relevanti għall-esponiment tal-bniedem. Għad li l-protokoll huwa mfassal għall-għoti tas-sustanza kimika tat-test permzz tad-dieta, jista' jiġi modifikat biex din tingħata b'rotot oħrajn (ilma tajjeb għax-xorb, gavage, teħid man-nifs, dermali), skont il-karatteristiċi tas-sustanza kimika u l-informazzjoni meħtieġa.

Għażla tal-veikolu

19. Meta jkun hemm bżonn, is-sustanza kimika tat-test tinħall jew tiġi sospiża f'veikolu xieraq. Huwa rakkomandat li, meta dan ikun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni milwiema, segwit minn kunsiderazzjoni ta' soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż., żejt tal-qamħirrun). Għal veikolu li mhumiex ilma, għandhom ikunu magħrufin il-karatteristiċi tossiċi tal-veikolu. L-użu ta' veikoli b'tossiċità intrinsika potenzjali għandu jiġi evitat (eż., aċetun, DMSO). Għandha tiġi ddeterminata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu. Għandhom jittieħdu f'kunsiderazzjoni l-karatteristiċi li ġejjin jekk jintuża veikolu jew additttiv ieħor biex jitħaffef id-dożaġġ: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu jew iż-żamma tas-sustanza kimika tat-test; effetti fuq il-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u effetti fuq il-konsum ta' ilma jew ikel jew l-istatus nutrizzjonali tal-annimali.

Għażla tad-doża

20. Normalment, l-istudju għandu jinkludi tal-inqas tliet livelli tad-doża u kontroll konkurrenti. Meta jingħażlu livelli xierqa tad-doża, l-investigatur għandu jqis l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni, inkluża informazzjoni dwar id-dożaġġ minn studji li saru qabel, dejta dwar it-TK minn annimali tqal jew mhux tqal, kemm iseħħ trasferiment fit-treddigħ, u stimi tal-esponiment tal-bniedem. Jekk hemm dejta dwar it-TK disponibbli li tindika saturazzjoni li tiddependi fuq id-doża tal-proċessi tat-TK, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġu evitati livelli tad-doża għoljin li jesibixxu b'mod ċar saturazzjoni, diment li ovvjament l-esponimenti tal-bniedem ikunu mistennijin ikunu f'livell ferm inqas mill-punt ta' saturazzjoni. F'dawn il-każijiet, l-ogħla livell tad-doża għandu jkun il-punt ta' inflezzjoni, jew fit ogħla minnu, għat-tranżizzjoni lejn imġiba mhux lineari tat-TK.

21. Fin-nuqqas ta' dejta rilevanti dwar it-TK, il-livelli tad-doża għandhom ikunu bbażati fuq effetti tossiċi, sakemm ma jkunux limtiati mill-għamla fiżika/kimika tas-sustanza kimika tat-test. Jekk il-livelli tad-doża jkunu bbażati fuq it-tossiċità, l-ogħla doża għandha tingħażel bl-għan li tikkaġuna xi tossiċità sistemika, iżda mhux mewt jew tbatija severa tal-annimali.

22. Għandha tingħażel sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża sabiex jintwera kwalunkwe effett relatat mad-doża u sabiex jiġu stabbiliti NOAELs jew dożi qrib il-limitu ta' identifikazzjoni li jippermetti sabiex tiġi derivata doża ta' riferiment għall-iktar punt(i) aħħari(n) sensittiv(i). Biex jiġi evitat spazju kbir bejn id-dożż tal-NOAELs u l-LOAELs, spiss intervalli d-doppju jew erba' darbiet ta' xulxin ikunu ottimali. Iż-żieda tar-raba' grupp tat-test spiss ikun ippreferut milli jintuża intervall kbir ħafna (eż., fattur ta' iktar minn 10) bejn id-dożi.

23. Ħlief għall-kura bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll jiġu ttrattati bl-istess mod bħas-suġġetti tal-grupp tat-test. Dan il-grupp ma għandux jingħata kura jew kura finta jew grupp ta' kontroll b'veikolu jekk jintuża veikolu fl-għoti tas-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża veikolu, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat.

▼M5

Test tal-limitu

24. Jekk ma hemm ebda evidenza ta' tossiċità b'doża ta' tal-inqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum fi studji b'doża ripetuta, jew jekk ma tkunx mistennija tossiċità fuq il-bażi ta' dejta minn sustanzi kimiċi relatati fil-livell strutturali u/jew metaboliku, li jindikaw similarità fil-proprjetajiet metaboliċi *in vivo*/*in vitro*, jista' ma jkunx hemm bżonn ta' studju li juża bosta livelli ta' doża. F'dawn il-każijiet, l-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda jista' jsir billi jintuża grupp ta' kontroll u doża waħda ta' tal-inqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Madankollu, jekk tinsab evidenza għal tossiċità riproduttiva jew tal-iżvilupp f'din id-doża ta' limitu, ser ikun hemm bżonn ta' studji b'livelli inqas tad-doża biex jiġi identifikat NOAEL. Dawn il-kunsiderazzjonijiet tat-test ta' limitu japplikaw biss meta l-esponiment tal-bniedem ma jkunx jindika l-bżonn ta' livell ta' doża ogħla.

PROĊEDURI

Esponiment tal-ulied

25. L-esponiment djetetiku huwa l-metodu ppreferut tal-għoti. Jekk isiru studji b'gavage, ta' min jinnota li l-frieħ normalment jirċievu s-sustanza kimika tat-test b'mod indirett mill-ħalib biss, sakemm jibda d-dożaġġ dirett tagħhom fil-ftim. Fi studji dwar id-dieta jew l-ilma tajjeb għax-xorb, il-frieħ jirċievu wkoll is-sustanza kimika tat-test direttament meta jibdew jieklu waħedhom matul l-aħħar ġimgħa tal-perjodu tat-treddigħ Għandhom jiġu kkunsidrati modifiki fit-tifsila tal-istudju meta l-eskrezzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-ħalib tkun batuta u meta jkun hemm nuqqas ta' evidenza għal esponiment kontinwu tal-ulied. F'dawn il-każijiet, għandu jiġi kkunsidrat dożaġġ dirett tal-frieħ matul il-perjodu tat-treddigħ fuq il-bażi tal-informazzjoni disponibbli dwar it-TK, it-tossiċità tal-ulied jew bidliet fil-bijomarkaturi (3)(4). Għandhom jingħataw kunsiderazzjoni attenta l-benefiċċji u l-iżvantaġġi qabel ma jsiru studji tad-dożaġġ dirett fuq frieħ li għadhom fil-faża tat-treddigħ (5).

Skeda tad-dożaġġ u għoti tad-doża

26. Jista' jkun hemm disponibbli ċerta informazzjoni dwar iċ-ċikli estruża, l-istopatoloġija tal-apparat riproduttiv tal-irġiel u n-nisa u analiżi tal-isperma epididimali/testikolari minn studji li saru fl-imgħoddi dwar it-tossiċità b'doża ripetuta ta' durata adegwata. Għalhekk, id-durata tal-kura qabel it-tgħammir fl-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda hija mfassla sabiex tidentifika l-effetti fuq bidliet funzjonali li jistgħu jinterferixxu mal-imġiba tat-tgħammir u l-fertilizzazzjoni. Il-kura ta' qabel it-tgħammir għandha tkun twila biżżejjed biex jinkisbu kundizzjonijiet ta' esponiment bi stat kostanti fl-irġiel u n-nisa P. F'ħafna mill-każijiet, kura ta' qabel it-tgħammir ta' ġimgħatejn għaż-żewġ sessi titqies li hija adegwata. Għan-nisa, din tkopri 3-4 ċikli estruża sħaħ u għandha tkun biżżejjed biex taqbad kwalunkwe effett avvers fuq iċ-ċikliċità. Għall-irġiel, din hija ekwivalenti għaż-żmien meħtieġ għal tranżitu epididimali tal-ispermatożoa li qed timmatura u għandha tippermetti li jiġu identifikati l-effetti posttestikolari fuq l-isperma (matul l-aħħar stadji tal-ispermjazzjoni u l-maturità tal-isperma epididimali) fit-tgħammir. Fil-ħin tat-terminazzjoni, meta jkunu skedati istopatoloġija testikolari u epididimali u analiżi tal-parametri tal-isperma, l-irġiel P u F_1 ser ikunu ġew esposti għal tal-inqas proċess spermatoġeniku wieħed sħiħ ((6)(7)(8)(9) u d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151(40)).

▼**M5**

27. Ix-xenarji ta' esponiment ta' qabel it-tgħammir għall-irġiel jistgħu jiġu adattati jekk fl-istudju preċedenti jkunu ġew oidentifikati b'mod ċar tossiċità testikolari (indeboliment tal-ispermatoġenesi) jew effetti fuq l-integrità u l-funzjoni tal-isperma. B'mod simili, għan-nisa, l-effetti magħrufin tas-sustanza kimika tat-test fuq iċ-ċiklu estruż u b'hekk anki r-riċettività sesswali, jistgħu jiġġustifikaw xenarji ta' esponiment ta' qabel it-tgħammir differenti. F'każijiet speċjali, jista' jkun aċċettabbli li kura tan-nisa P tinbeda biss wara li jkun inkiseb kampjun pożittiv għall-isperma (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151(40)).

28. Ladarba jiġi stabbilit il-perjodu ta' dożaġġ ta' qabel it-tgħammir, l-annimali għandhom jirċievu s-sustanza kimika tat-test kontinwament fuq bażi ta' 7 ijiem/ġimgħa san-nekropsija. L-annimali kollha għandhom jingħataw id-doża bl-istess metodu. Id-dożaġġ għandu jkompli matul il-perjodu ta' tgħammir ta' ġimgħatejn u, għan-nisa P, matul it-tqala u t-treddigħ sal-jum tat-terminazzjoni tal-annimal miftum. L-irġiel għandhom jiġu kkurati bl-istess mod sat-terminazzjoni fiż-żmien meta l-annimali F_1 jinfatmu. Għan-nekropsija, għandha tingħata prijorità lil nisa li għandhom jiġu nekropsjati fuq numru ikbar ta' jiem, skont il-faċilitajiet tal-laboratorju. Sakemm ma jkunx diġà nbeda matul il-perjodu tat-treddigħ, dożaġġ dirett tal-irġiel u n-nisa F_1 magħżulin għandu jinbeda fil-ftim u jkompli san-nekropsija skedata, skont l-assenjament tal-koorti.

29. Għal sustanzi kimiċi mogħtijin permezz tad-dieta jew ilma tajjeb għax-xorb, importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza kimika tat-test involuti ma jxekklux in-nutrizzjoni jew il-bilanċ tal-ilma normali. Meta s-sustanza kimika tat-test tingħata fid-dieta, jistgħu jitħaddmu jew konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal; l-għażla li ssir għandha tiġi speċifikata.

30. Meta s-sustanza kimika tat-test tingħata b'gavage, il-volum ta' likwidu mogħti f'darba normalment ma għandux jaqbeż il-1 ml/100 g piż tal-ġisem (0,4 ml/100 g piż tal-ġisem huwa l-massimu għaż-żejt, eż., żejt tal-qamħirrun). Ħlief għal sustanzi kimiċi irritanti jew korrożivi, li normalment juru effetti aggravat f'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Il-kura għandha tingħata f'ħinijiet simili ta' kull ġurnata. Normalment id-doża lil kull annimal għandha tkun ibbażata fuq l-iktar determinazzjoni riċenti tal-piż tal-ġisem individwali u tiġi aġġustata tal-inqas kull ġimgħa fl-irġiel adulti u n-nisa adulti mhux tqal, u kull jumejn f'nisa tqal u annimali F_1 meta tingħata qabel il-ftim u matul il-ġimgħatejn ta' wara l-ftim. Jekk id-dejta dwar it-TK tindika trasferiment baxx tal-plaċenta tas-sustanza kimika tat-test, id-doża b'gavage matul l-aħħar ġimgħa tat-tqala jista' jkollha bżonn tiġi aġġustata biex jiġi evitat għoti ta' doża tossika wisq lill-omm. In-nisa ma għandhomx jiġu kkurati b'gavage, jew xi rotta oħra tal-kura meta l-animal ikun jeħtieġ li jitqandel, dakinhar tal-ħlas; omissjoni tal-għoti tas-sustanza kimika tat-test dakinhar hija ppreferuta milli tfixkil tal-proċess tat-twelid.

▼M5

Tgħammir

31. Kull mara P għandha titqgħed ma' raġel waħdu magħżul b'mod aleatorju u mhux relatat mill-istess grupp tad-dożaġġ (tlaqqigħ 1:1) sakemm tiġi osservata evidenza ta' kopulazzjoni jew wara li jgħaddu ġimgħatejn. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed irġiel, pereżempju minħabba mewt ta' rġiel qabel it-tlaqqigħ, ir-raġel/l-irġiel li diġà tgħammru jistgħu jitlaqqgħu (1:1) mat-tieni mara/nisa b'tali mod li n-nisa kollha jkunu tlaqqgħu ma' raġel. Il-jum 0 tat-tqala huwa definit bħala l-jum li fih tiġi kkonfermata evidenza ta' tgħammir (jinstabu l-plakka vaġinali jew sperma). L-annimali għandhom jiġu separati malajr kemm jista' jkun wara li tiġi osservata evidenza ta' kopulazzjoni. Jekk ma jkunx seħħ tgħammir wara ġimgħatejn, l-annimali għandhom jiġu separati mingħajr ebda opportunità oħra ta' tgħammir. Il-pari li jitgħammru għandhom ikunu identifikati b'mod ċar fid-dejta.

Daqs tal-boton

32. Fil-jum 4 wara t-twelid, id-daqs ta' kull boton jista' jiġi aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda permezz ta' għażla aleatorja b'tali mod li jirriżultaw, kemm jista' jkun, ħamest irġiel u ħames nisa għal kull boton. L-eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż., fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem, mhijiex xierqa. Mull meta n-numru ta' frieħ irġiel jew nisa jipprevjeni milli jkun hemm ħamsa minn kull sess għal kull boton, huwa aċċettabbli li jsir aġġustament parzjali (pereżempju, sitt irġiel u erba' nisa).

L-għażla tal-frieħ għall-istudji ta' wara l-ftim (ara l-Figura 1)

33. Fil-ftim (madwar PND 21), jingħażlu frieħ mill-boton kollha għad-dispożizzjoni sa 20 għal kull doża u grupp ta' kontroll biex isiru iktar eżamijiet u dawn jinżammu sal-maturità sesswali (sakemm ma jkunx hemm bżonn li jsiru testijiet qabel). Il-frieħ jingħażlu b'mod aleatorju, bl-eċċezzjoni li annimali mhux żviluppati (dawk b'piż tal-ġisem f'livell iktar minn żewġ devjazzjonijiet standard inqas mill-piż medju tal-frieħ tal-boton rispettiv) ma għandhomx ikunu inklużi, peress li huwa improbabbli li ser ikunu jirrappreżentaw il-grupp tal-kura.

Fil-PND 21, il-frieħ F_1 magħżulin jiġu assenjati b'mod aleatorju f'waħda mit-tliet koorti tal-annimali, kif ġej:

Koorta 1 (1 A u 1B) = = Ittestjar tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp,

Koorta 2 (2 A u 2B) = = Ittestjar tan-newrotossiċità tal-iżvilupp,

Koorta 3 = = Ittestjar tan-immunotossiċità tal-iżvilupp.

Koorta 1 A:: Raġel wieħed u mara/boton/grupp 1 (20/sess/grupp): għażla ta' prijorità għall-valutazzjoni primarja tal-effetti fuq is-sistemi riproduttivi u tat-tossiċità ġenerali.

Koorta 1B:: Raġel wieħed u mara/boton/grupp 1 (20/sess/grupp): għażla ta' prijorità għal valutazzjoni ta' segwitu tal-prestazzjoni riproduttiva permezz ta' tgħammir ta' annimali F1, meta jiġu vvalutati (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 117(39)), u għall-kisba ta' dejta addizzjonali dwar l-istopatoloġija f'każijiet ta' tossikanti riproduttivi jew endokrinali suspettati, jew meta r-riżulati mill-koorta 1 A jfixklu.

Koorta 2 A:: Total ta' 20 ferħ għal kull grupp (10 irġiel u 10 nisa għal kull grupp; raġel wieħed jew mara waħda għal kull boton) assenjati għal ittestjar tan-newromġiba segwit minn valutazzjoni tan-newroistopatoloġija bħala adulti.

Koorta 2B:: Total ta' 20 ferħ għal kull grupp (10 irġiel u 10 nisa għal kull grupp; raġel wieħed jew mara waħda għal kull boton) assenjati għal valutazzjoni tan-newroistopatoloġija fil-ftim (PND 21 jew PND 22). Jekk ma jkunx hemm biżżejjed annimali, għandha tingħata preferenza l-assenjazzjoni tal-annimali fil-Koorta 2 A.

▼M5

Koorta 3:: Total ta' 20 ferħ għal kull grupp (10 irġiel u 10 nisa għal kull grupp; wieħed/waħda għal kull boton, fejn possibbli). Jista' jkun hemm bżonn ta' frieħ addizzjonali mill-grupp tal-kontroll biex jaġixxu bħala annimali tal-kontroll pożittiv fl-assaġġ tar-rispons tal-antikorpi dipendenti fuq iċ-ċellola T (TDAR) fil-PND 56 ± 3.

34. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed frieħ f'boton biex iservu l-koorti kollha, il-koorta 1 tieħu preċedenza, peress li tista' tkun estiża ħalli tipproduċi ġenerazzjoni F_2. Jistgħu jiġu assenjati frieħ addizzjonali fi kwalunkwe waħda mill-koorti f'każ ta' tħassib speċifiku, eż., jekk sustanza kimika tkun suspettata li hija newrotossikant jew tossikant riproduttiv. Dawn il-frieħ jistgħu jintużaw għal eżamijiet f'punti ta' żmien differenti jew għall-evalwazzjoni ta' punti aħħarin supplementari. Il-frieħ li ma jiġux assenjati f'koorti ser jiġu sottomessi għall-bijokimika klinika (paragrafu 55) u nekropsija grossa (paragrafu 68).

It-tieni tgħammir tal-annimali P

35. Normalment it-tieni tgħammir ma jkunx rakkomandat għall-annimali P, peress li jekk iseħħ tintilef informazzjoni importanti fuq in-numru ta' siti ta' impjant (u b'hekk dejta ta' telf wara l-impjant u perinatali, indikaturi ta' potenzjal teratoġeniku possibbli) għall-ewwel boton. Il-bżonn li jiġi verifikat jew evidenzjat effett f'nisa esposti jiġi ssodisfat aħjar billi l-istudju jiġi estiż ħalli jinkludi tgħammir tal-ġenerazzjoni F_1. Madankollu, it-tieni tgħammir tal-irġiel P ma' nisa mhux ikkurati dejjem huwa possibbiltà ħalli sejbiet ekwivoċi jiġu ċċarati jew għall-karatterizzazzjoni ulterjuri tal-effetti fuq il-fertilità osservati fl-ewwel tgħammir.

OSSERVAZZJONIJIET FIL-ĦAJJA

Osservazzjonijiet kliniċi

36. Għall-annimali P u dawk F_1 magħżulin, issir osservazzjoni klinika ġenerali darba kull jum. Fil-każ ta' dożaġġ b'gavage, it-twaqqit tal-osservazzjonijiet kliniċi għandu jkun qabel u wara d-dożaġġ (għal sinjali possibbli ta' tossiċità assoċjata mal-quċċata tal-konċentrazzjoni tal-plażma). Bidliet pertinenti fl-imġiba, sinjali ta' ħlas diffiċli jew imtawwal u s-sinjali kollha ta' tossiċità huma rreġistrati. Darbtejn kuljum, u fi tmiem il-ġimgħa darba kuljum, l-annimali kollha jiġu osservati għal tossiċità severa, morbidità u mortalità.

37. Barra minn hekk, isir eżami iktar dettaljat tal-annimali P u F_1 kollha (wara l-ftim) fuq bażi ta' kull ġimgħa u għal konvenjenza dan jista' jsir meta l-annimal jintiżen, b'tali mod li jitnaqqas l-istess marbut mat-tqandil. L-osservazzjonijiet għandhom isiru bir-reqqa u jiġu rreġistrati billi jintużaw sistemi ta' punteġġ li ġew definti mil-laboratorju ta' ttestjar. Għandom isiru sforzi biex jiġi żgurat li varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test huma minimi. Is-sinjali osservati għandhom jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, bidliet fil-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukuża, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż., dmugħ, piloerezzjoni, daqs tal-ħabba, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Bidliet fil-mixja, il-pożizzjoni, ir-rispons għat-tqandil, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, sterotipija (eż., traqqim eċċessiv, dawran ripetittiv) jew imġiba stramba (eż., awtomutilazzjoni, mixi lura) għandhom jiġu rreġistrati wkoll.

▼M5

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel/ilma

38. L-annimali P jintiżnu fl-ewwel jum tad-dożaġġ u tal-inqas kull ġimgħa minn hemm 'il quddiem. Barra minn hekk, nisa P jintiżnu matul it-treddigħ fl-istess jiem bħall-użin tal-frieħ fil-boton tagħhom (ara l-paragrafu 44). L-annimali F_1 kollha jintiżnu għalihom fil-ftim (PND 21) u tal-inqas darba fil-ġimgħa minn hemm 'il quddiem. Il-piż tal-ġisem jiġi rreġistrat ukoll dakinhar li jilħqu l-pubertà (isseħħ is-separazzjoni prepuzjali jew il-patenza vaġinali). L-annimali kollha jintiżnu fis-sagrifiċċju.

39. Matul l-istudju, il-konsum ta' ikel u ilma (fil-każ ta' għoti tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma tajjeb għax-xorb) huma rreġistrati tal-inqas darba fil-ġimgħa fl-istess jiem bħala piżijiet tal-ġisem tal-annimal (ħlief matul il-koabitazzjoni). Il-konsum ta' ikel ta' kull gaġġa ta' annimali F_1 huwa rreġistrat kull ġimgħa b'bidu mill-għażla f'koorta rispettiva.

Ċikli estrużi

40. Informazzjoni preliminari dwar l-effetti relatati mas-sustanza kimika tat-test fuq iċ-ċiklu estruż jaf diġà tkun disponibbli minn studji preċedenti dwar it-tossiċità b'doża ripetuta, u tista' tintuża fit-tfassil ta' protokoll speċifiku għas-sustanza kimika tat-test għall-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda. Normalment, il-valutazzjoni taċ-ċikliċità estruża (permezz ta' ċitoloġija vaġinali) ser tibda fil-bidu tal-perjodu tal-kura sal-konferma ta' tgħammir jew fi tmiem il-perjodu ta' tgħammir ta' ġimgħatejn. Jekk in-nisa tgħarblu għal ċikli estrużi normali qabel il-kura, ikun utli li jkomplu jittieħdu kampjuni hekk kif tinbeda l-kura, iżda jekk ikun hemm tħassib dwar effetti mhux speċifiċi fil-bidu tal-kura (bħal tnaqqis inizjali ċar fil-konsum ta' ikel), f'dak il-każ l-annimali jistgħu jitħallew jadattaw għall-kura sa ġimgaħtejn qabel il-bidu tal-perjodu ta' kampjunar ta' ġimgħatejn li jwassal għat-tgħammir. Jekk il-perjodu ta' kura tan-nisa jiġi estiż b'dan il-mod (jiġifieri kura ta' qabel it-tgħammir għal 4 ġimgħat), f'dak il-każ għandhom jittieħdu f'kunsiderazzjoni x-xiri ta' annimali iżgħar u l-estensjoni tal-perjodu tal-kura fuq l-irġiel qabel it-tlaqqigħ. Meta jinkisbu ċelloli vaġinali/ċervikali, għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata disturbanza tal-mukoża u mbagħad, l-induzzjoni tal-psewdotqala (10)(11).

41. Il-kampjuni meħudin mill-vaġina għandhom jiġu eżaminati kuljum għannisa F_1 kollha fil-koorta 1 A, wara l-bidu tal-patenza vaġinali, sakemm jiġi rreġistrat l-ewwel kampjun keratinizzat, sabiex jiġi ddeterminat l-intervall taż-żmien bejn iż-żewġ avvenimenti. Iċ-ċikli estrużi għan-nisa F_1 kollha fil-koorta 1 A għandu jiġi ssorveljat ukoll għal perjodu ta' ġimgħatejn, b'bidu minn madwar il-PND 75. Barra minn hekk, jekk ikun hemm bżonn li jsir tgħammir tal-ġenerazzjoni F_1, iċ-ċitoloġija vaġinali fil-koorta 1B ser tkun segwita minn żmien it-tlaqqigħ sakemm tinstab evidenza ta' tgħammir.

Tgħammir u tqala

42. Minbarra l-punti aħħarin standard (eż., piż tal-ġisem, konsum ta' ikel, osservazzjonijiet kliniċi inklużi verifiki tal-mortalità/morbidità), jiġu rreġistrati d-dati tat-tgħammir, id-data ta' inseminazzjoni u d-data tal-ħlas u jiġu kkalkolati l-intervall ta' qabel l-att sesswali (tlaqqigħ sal-inseminazzjoni) u d-durata tat-tqala (inseminazzjoni sal-ħlas). In-nisa P għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa fi żmien il-ħlas mistenni għal kwalunkwe sinjal ta' distoċja. Kwalunkwe anormalità fl-imġiba tat-tibjit jew il-prestazzjoni tat-treddigħ għandha tiġi rreġistrata.

▼M5

43. Il-jum li fih iseħħ il-ħlas huwa l-jum tat-treddigħ 0 (LD 0) għall-omm u l-jum ta' wara t-twelid 0 (PND 0) għall-wild. Inkella, it-tqabbil kollha jista' jkun imsejjes fuq żmien ta' wara l-att sesswali biex tiġi eliminata konfużjoni ta' dejta tal-iżvilupp ta' wara t-twelid, minħabba differenzi fid-durata tat-tqala; madankollu, it-twaqqit relatat mal-ħlas għandu jiġi rreġistrat ukoll. Dan huwa speċjalment importanti meta s-sustanza kimika tat-test teżerċita influwenza fuq id-durata tat-tqala.

Parametri tal-ulied

44. Kull boton għandu jiġi eżaminat malajr kemm jista' jkun wara l-ħlas (PND 0 jew 1) biex jiġu stabbiliti n-numru u s-sess tal-frieħ, ulied imwielda mejtin, ulied imwielda ħajjin, u l-preżenza ta' anomaliji grossi (anormalitajiet estrenament viżibbli, inklużi palat maqsum; emorraġiji taħt il-ġilda; kulur jew tonalità mhux tas-soltu tal-ġilda; preżenza tal-kurdun; nuqqas ta' ħalib fl-istonku; preżenza ta' tnixxijiet nixfin). Barra minn hekk, l-ewwel eżami kliniku tan-neonati għandu jinkludi valutazzjoni kwalitattiva tat-temperatura tal-ġisem, l-istat tal-attività u r-reazzjoni għat-tqandil. Il-frieħ misjubin mejtin fil-PND 0 jew fi żmien iktar tard għandhom jiġu eżaminati għal difetti u kawżi tal-mewt possibbli. Il-frieħ ħajjin jingħaddu u jintiżnu b'mod individwali fil-PND 0 jew PND 1, u b'mod regolari wara, eż., tal-inqas fil-PND 4, 7, 14, u 21. Eżamijiet kliniċi, kif applikabbli għall-età tal-annimali, għandhom jiġu ripetuti meta jintiżnu l-ulied, jew iktar spiss jekk isiru sejbiet speċifiċi għall-każ fit-twelid. Is-sinjali osservati jistgħu jinkludu, iżda ma jistgħux ikunu limitati għal, anormalitajiet esterni, bidliet fil-ġilda, il-piż, l-għajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u attività awtomatika. Bidliet fil-mixja, il-pożizzjoni, ir-rispons għat-tqandil, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, sterjotipija jew imġiba stramba, għandhom jiġu rreġistrati wkoll.

45. Id-distanza anoġenitali (AGD) ta' kull ferħ għandha titkejjel tal-inqas darba mill-PND 0 sal-PND 4. Il-piż tal-ġisem tal-frieħ għandu jinġabar dakinhar li titkejjel l-AGD u l-AGD għandha tiġi normalizzata għal kejl tad-daqs tal-ferħ, idealment l-għerq kwadrat tal-piż tal-ġisem (12). Il-preżenza ta' bżieżel/areoli fi frieħ irġiel għandhom jiġu verifikati fil-PND 12 jew 13.

46. L-annimali F_1 kollha magħżulin huma evalwati kuljum għal separazzjoni balano-prepuzjali jew patenza vaġinali għall-irġiel/nisa rispettivament b'bidu qabel il-jum mistenni għall-kisba ta' dawn il-punti aħħarin biex jinstab jekk maturità sesswali sseħħx kmieni. Għandha tittieħed nota ta' kwalunkwe anormalità tal-organi ġenitali, bħal ħajta vaġinali persistenti, ipospadija jew pene maqsum. Il-maturità sesswali tal-annimali F_1 titqabbel mal-iżvilupp fiżiku billi jiġu determinati l-età u l-piż tal-ġisem fis-separazzjoni balano-prepuzjali jew il-ftuħ vaġinali għall-irġiel/nisa rispettivament (13).

Valutazzjoni tan-newrotossiċità potenzjali tal-iżvilupp (koorti 2 A u 2B)

47. Għaxar annimali rġiel u 10 nisa tal-koorta 2 A u 10 annimali rġiel u 10 nisa tal-koorta 2B, minn kull grupp tal-kura (għal kull koorta: raġel 1 jew mara 1 għal kull boton; kull boton rappreżentat minn tal-inqas ferħ 1; għażla aleatorja) għandhom jintużaw għall-valutazzjonijiet tan-newrotossiċità. L-annimali tal-koorta 2 A għandhom ikunu soġġetti għal valutazzjonijiet tal-qatgħa awditorja, il-batterija osservazzjonali funzjonali, l-attività motorja (ara l-paragrafi 48-50), u n-newropatoloġija (ara l-paragrafi 74-75). Għandhom isiru sforzi biex jiġi

▼M5

żgurat li varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet kollha tat-test huma minimi u mhumiex sistematikament relatati mal-kura. Fost il-varjabbli li jitsgħu jaffettwaw l-imġiba huma l-livell tal-ħoss (eż. storbju intermittenti), it-temperatura, l-umdità, id-dawl, l-irwejjaħ, il-ħin tal-ġurnata, u distrazzjonijiet ambjentali. Ir-riżultati tal-assaġġi tan-newrotossiċità għandhom jiġu interpretati fir-rigward tal-meded storiċi xierqa ta' referenza tal-kontroll. L-annimali tal-koorta 2B għandhom jintużaw għall-valutazzjoni tan-newropatoloġija fil-PND 21 jew PND 22 (ara l-paragrafi 74-75).

48. Fil-PND 24 (± 1 jum) għandu jsir test ta' qatgħa awditorja billi jintużaw annimali fil-koorta 2 A. Il-jum tat-test għandu jkun kontrobilanċjat bejn il-gruppi tal-kura u ta' kontroll. Kull sessjoni tikkonsisti f'50 prova. Fit-twettiq tat-test tal-qatgħa awditorja, għandha tiġi determinata l-amplitudni medja tar-rispons f'kull blokka ta' 10 provi (5 blokok ta' 10 provi), bil-kundizzjonijiet tat-test ottimizzati ħalli tiġi prodotta drawwa bejn is-sessjonijiet. Dawn il-proċeduri għandhom ikunu konsistenti mal-metodu ta' ttestjar B.53 (35).

49. Fi żmien xieraq bejn il-PND 63 u l-PND 75, l-annimali tal-koorta 2 A jiġu soġġetti għal batterija osservazzjonali funzjonali u test awtomatizzat tal-attività motorja. Dawn il-proċeduri għandhom ikunu konsistenti mal-metodi ta' ttestjar B.43 (33) u B.53 (35). Il-batterija osservazzjonali funzjonali tinkludi deskrizzjoni deskrizzjoni dettaljata tad-dehra, l-imġiba u l-integrità funzjonali tas-suġġett. Din hija vvalutata permezz ta' osservazzjonijiet fil-gaġġa ta' oriġini, wara t-teħid f'arena standard għal osservazzjoni (fil-miftuħ) fejn l-annimal jiċċaqlaq b'libertà, u permezz ta' testijiet manipolattivi. It-testijiet għandhom jimxu mill-inqas sal-iktar interattivi. Lista ta' miżuri hija ppreżentata fl-Appendiċi 1. L-annimali kollha għandhom jiġu osservati bir-reqqa minn osservaturi mħarrġin li mhumiex konxji bl-istatus tal-kura tal-annimali, billi jintużaw proċeduri standardizzati ħalli tiġi minimizzata l-varjabbiltà tal-osservaturi. Fejn possibbli, huwa rakkomandat li l-istess osservatur jevalwa l-annimali f'test partikolari. Jekk dan mhuwiex possibbli, hemm bżonn li tintwera l-affidabbiltà ta' bejn l-ossevaturi. Għal kull parametru fil-batterija tal-ittestjar tal-imġiba, għandhom jintużaw gradi espliċiti definiti b'mod operazzjonali u kriterji tal-punteġġ. Jekk possibbli, għandhom jiġu żviluppati miżuri kwantitattivi oġġettivi għal punti aħħarin osservazzjonali, li jinvolvu klassifikazzjoni soġġettiva. Għal attività motorja, kull annimali jiġi ttestjat b'mod individwali. Is-sessjoni tat-test għandha tkun twila biżżejjed biex tintwera drawwa bejn is-sessjonijiet għall-kontrolli. L-attività motorja għandha tiġi ssorveljata permezz ta' apparat awtomatizzat ta' reġistrazzjoni tal-attività li għandu jkun kapaċi jidentifika kemm żidiet kif ukoll tnaqqisijiet fl-attività (jiġifieri l-attività bażi kif imkejla mill-apparat ma għandhiex tkun baxxa wisq tant li tipprekludi l-identifikazzjoni ta' tnaqqisiet, u lanqas għolja wisq tant li tipprekludi l-identifikazzjoni ta' żidiet fl-attivit). Kull apparat għandu jkun ittestjat permezz ta' proċeduri standard ħalli tiġi żgurata, kemm jista' jkun, l-affidabbiltà tal-operazzjoni bejn l-apparati u bejn il-jiem differenti. Kemm jista' jkun, il-gruppi tal-kura għandhom ikunu bbilanċjati bejn l-apparati. Il-gruppi tal-kura għandhom ikunu kontrobilanċjati bejn il-ħinijiet tat-test ħalli tiġi evitata konfużjoni minħabba ritmi ċirkadjani ta' attività.

50. Jekk l-informazzjoni eżistenti tindika l-bżonn li jsir ittestjar funzjonali ieħor (eż., sensorjali, soċjali, konjittiv), dawn għandhom jiġu integrati bla ma jikkompromettu l-integrità tal-evalwazzjonijiet l-oħrajn li saru fl-istudju. Jekk dan l-ittestjar isir fl-istess annimali kif użat għall-ittestjar tal-qatgħa awditorja standard, il-batterija osservazzjonali funzjonali u l-attività motorja, għandhom jiġu skedati testijiet differenti ħalli jiġi minimizzat ir-riskju ta' xekkil tal-integrità ta' dawn it-testijiet. Proċeduri supplementari jistgħu jkunu partikolarment utli meta osservazzjoni empirika, effetti antiċipati, jew il-mekkanistika/il-mod ta' azzjoni jindikaw tip sieċifiku ta' newrotossiċità.

▼M5

Valutazzjoni tal-immunotossiċità potenzjali tal-iżvilupp (koorta 3)

51. Fil-PND 56 (± 3 ijiem), 10 annimali rġiel u 10 nisa tal-koorta 3 minn kull grupp tal-kura (raġel 1 u mara 1 għal kull boton; il-boton kollha rappreżentati minn tal-inqas ferħ wieħed; magħżulin b'mod aleatorju) għandhom jintużaw f'assaġġ tar-rispons tal-antikorpi b'dipendenza fuq iċ-ċellola T, jiġifieri r-rispons primarju tal-antikorpi IgM għal antiġen li jiddependi fuq iċ-ċellola T, bħal Ċelloli Ħomor tad-Demm tan-Nagħaġ (SRBC) jew Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), konsistenti ma' proċeduri kurrenti ta' ttestjar tal-immunotossitià (14)(15). Ir-rispons jista' jiġi evalwat permezz ta' għadd taċ-ċelloli speċifiċi li jifformaw plakka (PF) fil-milsa jew billi jiġi determinat it-titru tal-antikorp IgM speċifiku għal SRBC jew KLH fis-serum minn ELISA, fl-ogħla livell tar-rispons. Ir-risponsi tipikament jilħqu l-ogħla livell erba' (rispons tal-PFC) jew ħamest (ELISA) ijiem wara l-immunizzazzjoni ġol-vina. Jekk ir-rispons primarju tal-antikorpi jiġi assaġġat permezz tal-għadd ta' ċelloli li jifformaw plakka, huwa permessibbli li jiġu evalwati sottogruppi ta' annimali f'jiem separati, diment li: l-immunizzazzjoni u s-sagrifiċċju tas-sottogruppi jsiru f'ċertu żmien b'tali mod li l-PFCs jingħaddu fl-ogħla livelli tar-rispons; li s-sottogruppi jkun fihom numru ndaqs ulied irġiel u nisa mill-gruppi kollha tad-doża, inklużi kontrolli; u li s-sottogruppi huma evalwati f'bejn wieħed u ieħor l-istess età ta' wara t-twelid. L-esponiment għas-sustanza kimika tat-test ikompli sal-jum ta' qabel il-ġbir tal-milsa għar-rispons tal-PFC jew is-serum għall-assaġġ tal-ELISA.

Valutazzjoni ta' segwitu tat-tossiċità riproduttiva potenzjali (koorta 1B)

52. L-annimali tal-koorta 1B jistgħu jinżammu fil-kura wara l-PND 90 u jitgħammru wkoll sabiex tinkiseb ġenerazzjoni F_2 jekk ikun hemm bżonn. L-irġiel u n-nisa tal-istess grupp tad-doża għandhom ikunu koabitati (biex jiġi evitat tlaqqigħ ta' aħwa) għal massimu ta' ġimgħatejn, li jibdew mill-PND 90 jew wara, iżda mhux wara mill-PND 120. Il-proċeduri għandhom ikunu simili għal dawk għall-annimali P. Madankollu, fuq il-bażi ta' piż tal-evidenza, jista' jkun biżżejjed li l-boton jiġu terminati fil-PND 4 minflok ma jkunu segwiti sal-ftim jew iktar.

OSSERVAZZJONIJIET TERMINALI

Bijokimika klinika/Ematoloġija

53. L-effetti sistemiċi għandhom jiġu ssorveljati fl-annimali P. Il-kampjuni tad-demm wara sawm minn siti definit jittieħdu minn għaxart irġiel u nisa P magħżulin b'mod aleatorju għal kull grupp tad-doża fit-terminazzjoni, jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa u jiġu soġġetti għal ematoloġija parzjali jew fuq skala sħiħa, bijokimika klinika, assaġġ tat-T4 u t-TSH jew eżamijiet oħrajn issuġġeriti mill-profil tal-effetti magħruf tas-sustanza kimika tat-test (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151(40)). Il-parametri ematoloġiċi li ġejjin għandhom jiġu eżaminati: ematokrit, konċentrazzjoni ta' emoglobina, għadd tal-eritroċita, għadd totali u differenzjali tal-lewkoċita, għadd tal-pjastrini u ħin/potenzjal ta' għoqiedi tad-demm. Investigazzjonijiet ta' plażma jew serum għandhom jinkludu: glukożju, kolesterol totali, urea, kreatinina, proteina totali, albumina u tal-inqas żewġ enżini li jindikaw effetti epatoċellolari (bħal alanina aminotrasferasi, aspartati aminotrasferasi, alkalina fosfatasi, gamma glutamil transpeptidasi u sorbitol deidroġenasi). Il-kejliet ta' enżimi u aċidi biljari addizzjonali jistgħu jipprovdu informazzjoni utli f'ċerti ċirkustanzi. Barra minn hekk, jista' jittieħed demm mill-annimali kollha u dan għandu jinħażen għal analiżi possibbli iktar tard biex jgħin ħalli jiġu ċċarati effetti ekwivokali

▼M5

jew sabiex tiġi ġġenerata dejta dwar l-esponiment intern. Jekk ma jkunx se jsir it-tieni tgħammir tal-annimali P, il-kampjuni tad-demm jittieħdu eżatt qabel il-proċedura fis-sagrifiċċju skedat, jew bħala parti minnha. F'każ li l-annimali jinżammu, il-kampjuni tad-demm għadhom jinġabru ftit jiem qabel ma l-annimali jitgħammru għat-tieni darba. Sakemm id-dejta eżistenti minn studji b'doża ripetuta ma jindikawx li l-parametru mhuwiex affettwat mis-sustanza kimika tat-test, għandha ssir urinaliżi qabel it-terminazzjoni u għandhom jiġu evalwati l-parametri li ġejin: id-dehra, il-volum, l-ożmolalità jew il-gravità speċifika, il-pH, il-proteina, il-glukożju, id-demm u ċ-ċelloli tad-demm, il-fdalijiet taċ-ċelloli. L-urina tista' tinġabar ukoll biex tiġi ssorveljata l-eskrezzjoni tas-sustanza kimika tat-test u/jew il-metabolita/i.

54. L-effetti sistemiċi għandhom jiġu ssorveljati wkoll fl-annimali F_1. Kampjuni tad-demm wara sawm minn sit definit jittieħdu minn għaxart irġiel u nisa magħżulin b'mod aleatorju mill-koorta 1 A għal kull doża tal-grupp fit-terminazzjoni, jinħażnu fil-kundizzjonijiet xierqa u jiġu soġġetti għal bijokimika klinika standard, inkluża l-valutazzjoni tal-livelli tas-serum għal ormoni tat-tirojde (T4 u TSH), ematoloġija (għadd totali u differenzjali tal-lewkoċite flimkien mal-eritroċite) u valutazzjonijiet tal-urinaliżi.

55. Il-frieħ żejda fil-PND 4 huma soġġetti għal nekropsija grossa u tingħata kunsiderazzjoni għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tas-serum fl-ormon tat-tirojde (T4). Jekk ikun hemm bżonn, id-demm ta' dawk li jkunu għadhom kif twieldu (PND 4) jista' jinġabar skont il-boton għal analiżijiet bijokimiċi/tal-ormon tat-tirojde. Id-demm jinġabar ukoll għal analiżi tat-T4 u t-TSH mill-frieħ li għadhom kif infatmu soġġetti għal nekropsija grossa fil-PND 22 (frieħ F_1 mhux magħżulin għal koorti).

Parametri tal-isperma

56. Il-parametri tal-isperma għandhom jitkejlu fl-irġiel kollha tal-ġenerazzjoni P sakemm ma jkunx hemm dejta eżistenti x'turi li l-parametri tal-isperma mhumiex affettwati fi studju ta' 90 jum. Eżami tal-parametri tal-isperma għandu jsir fl-irġiel kollha tal-koorta 1 A.

57. Fit-terminazzjoni, il-piżijiet tat-testikoli u tal-epididimi jiġu rreġistrati għall-irġiel P u F_1 (koorta 1 A) kollha. Tal-inqas testikola waħda u epididima waħda jinżammu għal eżami istopatoloġiku. L-epididima li jfidal tintuża għal enumerazzjoni tar-riżervi tal-isperma tal-epididima cauda (16)(17). Barra minn hekk, l-isperma mill-epididima auda (jew vas deferens) tinġabar billi jintużaw il-metodi li jnaqqsu l-ħsara għall-evalwazzjoni tal-motilità u l-morfoloġija tal-isperma (18).

58. Il-motilità tal-isperma tista' jew tiġi evalwata minnufih wara s-sagrifiċċju jew inkella tiġi rreġistrata għal analiżi iktar tard. Il-perċentwal ta' sperma motili b'mod progressiv jista' jiġi determinat jew b'mod soġġettiv jew oġġettiv permezz ta' analiżi taċ-ċaqliq assistita bil-kompjuter (19)(20)(21)(22)(23)(24). Għall-evalwazzjoni tal-morfoloġija tal-isperma, kampjun tal-isperma epididimali (jew vas deferens) għandu jiġi eżaminat bħala preparazzjonijiet fissi jew imxaarrbin (25) u tal-inqas 200 spermatożoa għal kull kampjun għandhom jiġu klassifikti jew bħala normali (kemm ir-ras u l-biċċa tan-nofs/id-denb jidhru normali) jew inkella anormali. Eżempji ta' anormalitajiet morfoloġiċi tal-isperma jinkludu fużjoni, irjus iżolati, u rjus u/jew dnub sfigurati (26). Irjus tal-isperma sfigurati jew kbar jistgħu jindikaw difetti fl-ispermjazzjoni.

59. Jekk il-kampjuni tal-isperma jkunu ffriżati, il-kampjuni fissati u l-immaġnijet għall-analiżi tal-motilità tal-isperma jiġu rreġistrati fil-ħin tan-nekropsija (27), analiżi sussegwenti tista' tkun ristretta għal irġiel tal-kontroll u dawk ta' doża għolja. Madankollu, jekk jiġu ossrevati effetti relatati mal-kura, il-gruppi ta' doża inqas ikollhom jiġu evalwati wkoll.

▼M5

Nekropsija grossa

60. Fi żmien it-terminazzjoni jew il-mewt prematura, l-annimali P u F_1 kollha jiġu nekropsjati u eżaminati b'mod mikroskopiku għal kwalunkwe anomalità strutturali jew bidla patoloġika. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għal-organi tas-sistema riproduttiva. Il-ħrief li jinqatlu b'mod dinjituż f'kundizzjoni moribonda u l-ħrief mejtin għandhom jiġu rreġistrati u, meta jkunu għadhom sħaħ, jiġu eżaminati għal difetti possibbli u/jew kawża tal-mewt u jinżammu.

61. Għal nisa P u F_1 adulti, kampjun vaġinali jiġi eżaminat dakinhar tan-nekropsija biex jiġi determinat l-istadju taċ-ċiklu estruż u tkun tista' ssir korrelazzjoni mal-istopatoloġija fl-organi riproduttivi. L-utri tan-nisa P kollha (u n-nisa F_1, jekk applikabbli) jiġu eżaminati għall-preżenza u n-numru ta' siti tal-impjant, b'tali mod li ma jxekkilx l-evalwazzjoni istopatoloġika.

Piż tal-organi u preservazzjoni tat-tessuti — annimali adulti P u F_1

62. Fil-ħin tat-terminazzjoni, il-piżijiet tal-ġisem u l-piżijiet imxarrbin tal-organi elenkati hawn taħt mill-annimali P kollha u l-adulti F_1 kollha, minn koorti rilevanti (kif spjegat hawn taħt), huma determinati malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex jiġi evitat milli jinxfu. Imbagħad, dawn l-organi għandhom jiġu ppreservati fil-kundizzjonijiet xierqa. Sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor, l-organi f'pari jistgħu jintiżnu b'mod individwali jew flimkien, b'mod konsistenti mal-prattika tipika tal-laboratorju li jagħmel ix-xogħol.

— Utru (b'kanali salovarji u ċerviċi), ovarji,

— Testikoli, epididimidi (total u cauda għall-kampuni użati għall-għadd tal-isperma),

— Prostata (il-partijiet dorsolaterali u ventrali f'daqqa). Għandha tingħata attenzjoni meta jinqatal-kumpless tal-prostata biex jiġi evitat titqib tan-nuffati seminali mimlijin fluwidu. Fil-każ ta' effett relatat mal-kura fuq il-piż totali tal-prostata, is-segmenti dorsolaterali u ventrali għandhom jiġu dissezzjonati bir-reqqa wara l-fissazzjoni, u għandhom jintiżnu b'mod separat,

— Nuffati seminali bi glandoli koagulanti u l-fluwidi tagħhom (bħala unità waħda),

— Moħħ, fwied, kliewi, qalb, milsa, il-glandoli tat-timu, pitwitarja, tat-tirojde (wara l-fissazzjoni), adrenali u l-organi jew it-tessuti fil-mira magħrufin.

63. Minbarra l-organi elenkati hawn fuq, kampjuni ta' nerv periferali, muskolu, sinsla tad-dahar, għajn flimkien man-nerv ottiku, apparat gastrointestinali, apparat tal-urina, pulmun, trakea (bit-tirojde u l-paratirojde mqabbdin), mudullun tal-għadam, vas deferens (irġiel), glandola tal-ħalib (irġiel u nisa) u vaġina għandhom jiġu ppreservati f'kundizzjonijiet xierqa.

64. L-organi kollha tal-annimali tal-koorta 1 A ser jintiżnu u ser jiġu ppreservati għal istopatoloġija.

65. Għall-investigazzjoni ta' effetti immunotossiċi kkaġunati qabel u wara t-twelid, 10 annimali rġiel u 10 nisa mill-koorta 1 A minn kull grupp tal-kura (raġel wieħed jew mara waħda għal kull boton; il-boton kollha rappreżentati minn tal-inqas ferħ 1; għażla aleatorja) ser ikunu soġġetti għal dan li ġej fit-terminazzjoni:

— ser jintiżnu n-nodi tal-limfa assoċjati ma' u distanti mir-rotta ta' esponiment (minbarra l-piż tal-glandoli adrenali, it-timu u l-milsa, li diġà sar fl-annimali kollha tal-koorta 1 A),

▼M5

— analiżi tal-limfoċite splenika tas-sottopopolazzjoni (limfoċiti T, limfoċiti B ta' CD4+ u CD8+ u ċelloli qattiela naturali) billi jintuża nofs il-milsa, bin-nofs l-ieħor tal-milsa jinżamm għal evalwazzjoni istopatoloġika.

Analiżi tas-sottopopolazzjoni tal-limfoċite splenika f'annimali mhux immunizzati (koorta 1 A) ser tiddetermina jekk l-esponiment huwiex relatat ma' bidla fid-distribuzzjoni immunoloġika fi stat kostanti ta' limfoċiti "li jgħinu" (CD4+) jew ċitotossiċi (CD8+) li ġejjin mit-timu jew ċelloli qattiela naturali (NK) (risponsi rapidi għal ċelloli neoplastiċi u patoġeni).

66. Għall-annimali tal-koorta 1B, għandhom jintiżnu l-organi li ġejjin u jiġu pproċessati għall-istadju tal-blokk it-tessuti korrispondenti li ġejjin:

— Vaġina (mingħajr ma tintiżen),

— Utru biċ-ċerviċi,

— Ovarji,

— Testikoli (tal-inqas waħda),

— Epididimidi,

— Nuffati seminali u glandoli koagulanti,

— Prostata,

— Pitwitarja,

— Organi fil-mira identifikati.

L-istopatoloġija fil-koorta 1B issir jekk ir-riżultati mill-koorta 1 A joħolqu ekwivoku jew f'każijiet ta' tossikanti riproduttivi jew endokrinali ssuspettati.

67. Il-koorti 2 A u 2B: Ittestjar tan-newrotossiċità tal-iżvilupp (PND 21 jew PND 22 u ulied adulti). L-annimali tal-koorta 2 A huma terminati wara ttestjar tal-imġiba, bil-piż tal-moħħ irreġistrat u newroistopatoloġija sħiħa għal skopijiet ta' valutazzjoni tan-newrotossiċità. L-annimali tal-koorta 2B huma terminati fil-PND 21 jew PND 22, bil-piż tal-moħħ irreġistrat u eżami mikroskopiku tal-moħħ għal finijiet tal-valutazzjoni tan-newrotossiċità. Il-fissazzjoni tal-perfużjoni hija meħtieġa għall-annimali tal-koorta 2 A u fakultattiva għal annimali tal-koorta 2B, kif stipulat fil-metodu ta' ttestar B.53 (35).

Piż tal-organi u preservazzjoni tat-tessuti — Annimali F_1 miftumin

68. Il-frieħ mhux magħżulin għal koorti, inklużi frieħ żgħar wisq, huma terminati wara l-ftim, fil-PND 22, sakemm ir-riżultati ma jindikawx il-bżonn ta' iktar investigazzjonijiet matul il-ħajja. Il-frieħ terminati huma soġġetti għal nekropsija grossa inkluża valutazzjoni tal-organi riproduttivi, kif deskritti fil-paragrafi 62 u 63. Għal massimu ta' 10 frieħ għal kull sess għal kull grupp, minn kemm jista' jkun boton, il-moħħ, il-milsa, u t-timu għandhom jintiżnu u jinżammu f'kundizzjonijiet xierqa. Barra minn hekk, it-tessuti mammarji għal dawn il-frieħ irġiel u nisa jistgħu jiġu ppreservati għal analiżijiet mikroskopiċi ulterjuri [1] (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151 (40)). L-anomalitajiet grossi u t-tessuti fil-mira għandhom jinżammu għal eżami istoloġiku possibbli.

[1] Ir-riċerka wriet li l-glandola tal-ħalib, speċjalment fl-iżvilupp tal-glandola tal-ħalib fil-ħajja bikrija, hija punt aħħari sensittiv għal azzjoni estroġena. Huwa rakkomandat li, meta jkunu validati, f'dan il-metodu ta' ttestjar għandhom ikunu inklużi l-punti aħħarin li jinvolvu l-glandoli tal-ħalib tal-frieħ taż-żewġ sessi.

▼M5

Istopatoloġija — annimali P

69. Istopatoloġija sħiħa tal-organi elenkati fil-paragrafi 62 u 63 issir għall-annimali P kollha tad-doża għolja u ta' kontroll. L-organi li juru bidliet relatati mal-kura għandhom jiġu eżaminati fl-annimali kollha fil-gruppi ta' doża inqas sabiex jgħinu fid-determinazzjoni ta' NOAEL. Barra minn hekk, l-organi riproduttivi tal-annimali kollha ssuspettati b'fertilità mnaqqsa, eż., dawk li naqsu milli jitgħammru, iwelldu, inisslu, jew iwelldu wlied b'saħħithom, jew li għalihom ġew affettwati ċ-ċikliċità estrużi jew in-numru, il-motilità, jew il-morfoloġija tal-isperma u l-leżjonijiet gross kollha għandhom ikunu soġġetti għal evalwazzjoni istopatoloġika.

Istopatoloġija — Annimali F_1

Annimali tal-koorta 1

70. Issir istopatoloġija sħiħa tal-organi elenkati fil-paragrafi 62 u 63 għall-annimali adulti kollha ta' doża għolja u tal-kontroll mill-koorta 1 A. Il-boton kollha għandhom ikunu rappreżentanti minn tal-inqas ferħ 1 għal kull sess. L-organi u t-tessuti li juru bidliet relatati mal-kura u l-leżjonijiet gross kollha għandhom ikunu eżaminati fl-annimali kollha fil-gruppi ta' doża inqas biex jgħinu fid-determinazzjoni ta' NOAEL. Għall-evalwazzjoni ta' effetti kkaġunati qabel u wara t-twelid fuq organi limfojdi, għandha tiġi evalwata wkoll l-istopatoloġija ta' 10 annimali rġiel u 10 nisa mill-koorta 1 A fuq in-nodi tal-limfa u l-mudullun tal-għadam miġburin wara l-evalwazzjoni istopatoloġika tat-timu, il-milsa, u l-glandoli adrenali li diġà saret fl-annimali 1 A kollha.

71. Tessuti riproduttivi u endokrinali mill-annimali kollha tal-koorta 1B, ipproċessati għall-istadju tal-blokk kif spjegat fil-paragrafu 66, għandhom jiġu eżaminati għal istopatoloġija f'każijiet ta' tossikanti riproduttivi jew endokrinali ssuspettati. Il-koorta 1B għandu jsirilha wkoll eżami istoloġiku jekk ir-riżultati mill-koorta 1 A joħolqu ekwivoku.

72. L-ovarji ta' nisa adulti għandu jkun fihom follikoli primordjali u li qed jikbru, kif ukoll corpora lutea; għalhekk, eżami istopatoloġiku għandu jkollu l-għan li jidentifika evalwazzjoni kwantitattiva tal-follikoli primordjali u oħrjan żgħar li qed jikbru, kif ukoll corpora lutea, f'nisa F_1; in-numru ta' annimali, l-għażla tas-sezzjoni tal-ovarji, u d-daqs tal-kampjun tas-sezzjoni għandhom ikunu statistikament xierqa għall-proċedura ta' evalwazzjoni użata. L-enumerazzjoni follikolari tista' ssir għall-ewwel fuq annimali tal-kontroll u ta' doża għolja, u fil-każ ta' effett avvers f'dawn tal-aħħar, għandhom jiġu eżaminati dożi inqas. L-eżami għandu jinkludi enumerazzjoni tan-numru ta' follikoli primordjali, li jista' jingħaqad ma' follikoli żgħar li qed jikbru, għat-tqabbil ta' ovarji kkurati u tal-kontroll (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151 (40)). Il-valutazzjoni tal-corpora lutea għandha ssir b'mod parallel mal-ittestjar taċ-ċikliċità estruża sabiex l-istadju taċ-ċiklu jkun jista' jittieħed f'kunsiderazzjoni fil-valutazzjoni. Il-kanal salovarju, l-utru u l-vaġina jiġu eżaminati għal żvilupp xieraq tipiku tal-organi.

73. Eżamijiet dettaljati tal-itsopatoloġija testikolari jsiru fuq l-irġiel F_1 sabiex jiġu identifikati effetti relatati mal-kuar fuq id-differenzazzjoni u l-iżvilupp tat-testikoli u fuq l-ispermatoġenesi (38). Meta jkun possibbli, għandhom jiġu eżaminati sezzjonijiet tax-xibka testikolari. Caput, corpus, u cauda tal-epididimi u l-vas deferens jiġu eżaminati għal żvilupp xieraq tipiku tal-organi, kif ukoll għall-parametri meħtieġa għall-irġiel P.

▼M5

Annimali tal-koorta 2

74. Issir newroistopatoloġija għall-annimali kollha ta' doża għolja u tal-kontroll tal-koorta 2 A għal kull sess wara li jitlesta l-ittestjar tan-newromġiba (wara PND 75, iżda mhux wara PND 90). L-istopatoloġija tal-moħħ issir għall-annimali kollha ta' doża għolja u tal-kontroll tal-koorta 2B għal kull sess fil-PND 21 jew PND 22. L-organi jew it-tessuti li juru bidliet relatati mal-kura għandhom jiġu eżaminati wkoll għall-annimali fil-gruppi ta' doża inqas biex titħaffef id-determinazzjoni ta' NOAEL. Għall-annimali tal-koorta 2 A u 2B, jiġu eżaminati bosta sezzjonijiet mill-moħħ biex ikun jista' jsir eżami tal-basal olfattivi, il-kortiċi ċerebrali, l-ippokampu, il-gangliji tal-bażi, it-talamu, l-ipotalamu, il-meżenċefalu (tekum, tegmentum, u pendunkuli ċerebrali), iz-zokk enċefaliku u ċ-ċervellett. Għall-koorta 2 A biss, jiġu eżaminati l-għajnejn (ir-retina u n-nerv ottiku) u kampjuni ta' nerv periferiku, muskolu u sinsla tad-dahar. Il-proċeduri newroistoloġiċi kollha għandhom ikun konsistenti mal-metodu ta' ttestjar B.53 (35).

75. Għandhom isiru evalwazzjonijiet morfometriċi (kwantitattivi) fuq żoni rappreżentattivi tal-moħħ (sezzjonijiet omologi magħżulin bir-reqqa fuq il-bażi ta' punti mikroskopiċi ta' riferiment affidabbli) u jistgħu jinkludu kejliet lineari u/jew areali ta' reġjuni speċifiċi tal-moħħ. Għandhom jittieħdu tal-inqas tliet sezzjonijiet konsekuttivi f'kull punt ta' riferiment (livell) sabiex tingħażel l-iktar sezzjoni omologa u rappreżentattiva għaż-żona speċifika tal-moħħ li ser tiġi evalwata. In-newropatoloġist għandu jeżerċita ġudizzju xieraq dwar jekk it-taqsimiet imħejjin għall-kejl humiex omologi ma' oħrajn fis-sett tal-kampjun u għaldaqstant, xierqa għal inklużjoni, peress li l-kejliet lineari b'mod partikolari jistgħu jinbidlu fuq distanza relattivament qasira (28). Ma għandhomx jintużaw sezzjonijiet mhux omologi. Filwaqt li l-għan huwa li jittieħed kampjun tal-annimali kollha riżervati għal dan l-għan (10/sess/livell tad-doża), numri inqas xorta jistgħu jkunu adegwati. Madankollu, kampjuni minn inqas minn 6 annimali/sess/-livell tad-doża ġeneralment ma jitqisux biżżejjed għall-finijiet ta' dan il-metodu ta' ttestjar. L-istereoloġija tista' tintuża biex tidentifika effetti relatati mal-kura fuq parametri bħall-volum jew in-numru ta' ċelloli għar-reġjuni newroanatomiċi speċifiċi. L-aspetti kollha tat-tħejjija tal-kampjuni tat-tessuti, mill-fissazzjoni tat-tessuti, sad-dissezzjoni tal-kampjuni tat-tessuti, l-ipproċessar tat-tessuti, u t-tilwin tas-slides, għandhom iħaddmu disinn kontrobilanċjat, b'tali mod li kull lott ikun fih kampjuni rappreżentattivi minn kull grupp tad-doża. Meta jkunu ser jintużaw analiżijiet morfometriċi jew stereoloġiċi, it-tessut tal-moħħ għandu jitqiegħed fil-midjums xierqa fil-livelli tad-doża kollha fl-istess ħin sabiex jiġu evitati tiċkin tal-oġġetti assoċjat ma' ħżin prolungat f'fissattiv.

RAPPORTAR

Dejta

76. Id-dejta tiġi rrapportata b'mod individwali u tinġabar fil-qosor f'forma ta' tabelli. Fejn xieraq, għal kull grupp tat-test u kull ġenerazzjoni, għandhom jiġu rrapportati dawn i ġejjin: in-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjubin mejtin matul it-test jew inqatlu għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' kwalunkwe mewta jew qtil umanitarju, in-numru ta' annimali fertili, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' nisa li qed iwelldu boton, u n-numru ta' annimali li qed juru sinjali ta' tossiċità. Għandha tiġi rrapportata wkoll deskrizzjoni tat-tossiċità, inklużi l-ħin tal-bidu, id-durata u s-severità.

77. Ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu rrapportati permezz ta' metodu statistiku xieraq u aċċettat. Il-metodi statistiċi għandhom jingħażlu bħala parti mid-disinn tal-istudju u għandhom jindirizzaw kif xieraq dejta mhux normali (eż., dejta tal-għadd), dejta ċċensurata (eż., ħin ta' osservazzjoni limitat), nuqqas ta' indipendenza (eż., effetti tal-boton u miżuri ripetuti) u

▼M5

varjanzi mhux indaqs. Mudelli mħalltin lineari ġeneralizzati u mudelli ta' rispons għad-doża jkopru klassi wiesgħa ta' għodod analitiċi li jistgħu jkunu xierqa għad-dejta ġġenerata f'dan il-metodu ta' ttestjar. Ir-rapport għandu jinkludi biżżejjed informazzjoni dwar il-metodu ta' analiżi u l-programm tal-kompjuter użat, sabiex statitsiku/reviżur indipendenti jkun jista' jevalwa/jerġa' jevalwa l-analiżi.

Evalwazzjoni tar-riżultati

78. Is-sejbiet għandhom jiġu evalwati f'termini tal-effetti osservati, inklużi sejbiet mikroskopiċi u fin-nekropsija. L-evalwazzjoni tinkludi r-relazzjoni, jew in-nuqqas tagħha, bejn id-doża u l-preżenza, l-inċidenza u s-severità tal-anormalitajiet, inklużi leżjonijiet grossi. Għandhom jiġu vvalutati wkoll l-organi fil-mira, il-fertilità, l-anormalitajiet kliniċi, il-prestazzjoni riproduttiva u tal-boton, il-bidliet fil-piż tal-ġisem, il-mortalità u kwalunkwe effett tossiku u tal-iżvilupp ieħor. Għandha tingħata attenzjoni speċjali lil bidliet speċifiċi għas-sess. Il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, u meta disponibbli, dejta dwar it-TK, inklużi t-trasferiment plaċentali u l-eskrezzjoni tal-ħalib, għandhom jiġu kkunsidrati wkoll meta jiġu evalwati r-riżultati tat-test.

Rapport tat-test

79. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja miksuba f'dan l-istudju minn annimali P, F_1 u annimali F_2 (fejn rilevanti):

Sustanza kimika tat-test:

— L-informazzjoni rilevanti disponibbli kollha dwar il-proprjetajiet kimiċi, tossikokinetiċi u tissikodinamiċi tas-sustanza kimika tat-test,

— Id-dejta ta' identifikazzjoni,

— Il-purità.

Veikolu (jekk xieraq):

— Il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu jekk mhuwiex ilma.

Annimali tat-test:

— L-ispeċi/ir-razza użati,

— In-numru, l-età u s-sess tal-annimali,

— Is-sors, il-kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija, id-dieta, il-materjali tat-tibjit, eċċ.,

— Il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test,

— Dejta dwar il-kampjun vaġinali għal nisa P qabel tinbeda l-kura (jekk id-dejta tinġabar f'dak iż-żmien),

— Rekords dwar it-tlaqqigħ tal-ġenerazzjoni P li jindikaw is-sieħeb u s-sieħba li tgħammru u s-suċċess tat-tgħammir,

— Rekords dwar il-boton ta' oriġini għall-annimali adulti tal-ġenerazzjoni F_1.

Kundizzjonijiet tat-test:

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tal-livell tad-doża,

— Dettalji tal-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/preparazzjoni tad-dieta, il-konċentrazzjonijiet miksubin,

▼M5

— L-istabbiltà u l-omoġenità tal-preparazzjoni fil-veikolu jew it-trasportatur (eż., dieta, ilma tajjeb għax-xorb), fid-demm u/jew il-ħalib bil-kundizzjonijiet ta' użu u ħżin bejn l-użi,

— Dettalji tal-għoti tas-sustanza kimika tat-test,

— Konverżjoni minn konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (ppm) f'ilma tajjeb għax-xorb/dieta għad-doża miksuba (mg/kg piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli,

— Dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u l-ilma (inkluża l-kompożizzjoni tad-dieta, jekk disponibbli),

— Deskrizzjoni dettaljata tal-proċeduri ta' każwalizzazzjoni biex jingħażlu frieħ għas-separazzjoni u biex jiġu assenjati frieħ għall-gruppi tat-test,

— Il-kundizzjonijiet ambjentali,

— Il-lista tal-persunal tal-istudju, inkluż it-taħriġ professjonali.

Riżultati (sommarju u dejta individwali skont is-sess u d-doża):

— Konsum ta' ikel, konsum ta' ilma jekk disponibbli, effiċjenza tal-ikel (żieda fil-piż tal-ġisem għal kull gramma ikel ikkonsmat, ħlief għall-perjodu ta' koabitazzjoni u matul it-treddigħ), u konsum tas-sustanza kimika tat-test (għal għoti permezz ta' dieta/ilma tajjeb għax-xorb) għall-annimali P u F_1,

— Dejta dwar l-assorbiment (jekk disponibbli),

— Dejta dwar il-piż tal-ġisem għall-annimali P,

— Dejta dwar il-piż tal-ġisem għall-annimali F_1 magħżulin wara l-ftim,

— Il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew jekk l-annimali baqgħux ħajjin wara t-terminazzjoni,

— L-għamla, is-severità u d-durata tal-osservazzjonijiet kliniċi (jekk humiex riversibbli jew le),

— Dejta dwar l-ematoloġija, l-urinaliżi u l-kimika klinika inklużi TSH u T4,

— Analiżi fenotipika taċ-ċelloli tal-milsa (ċelloli T, B, NK),

— Ċelloli tal-mudullun tal-għadam,

— Dejta dwar ir-rispons tossiku,

— In-numru ta' nisa P u F_1 b'ċiklu estruż normali jew anormali u d-durata taċ-ċiklu,

— Żmien sat-tgħammir (intervall qabel l-att sesswali, in-numru ta' jiem bejn it-tlaqqigħ u t-tgħammir),

— Effetti tossiċi jew oħrajn fuq ir-riproduzzjoni, inklużi numri u perċentwali ta' annimali li rnexxew fit-tgħammir, it-tqala, il-ħlas u t-treddigħ, ta' rġiel li kkaġunaw it-tqala, ta' nisa b'sinjali ta' distoċja/ħlas prolungat jew diffiċili,

— Id-durata tat-tqala u, jekk disponibbli, tal-ħlas,

— In-numri ta' impjanti, id-daqs tal-boton u l-perċentwal ta' frieħ irġiel,

— In-numru u l-perċentwal ta' telf ta' wara l-impjant, annimali mwielda ħajjin u annimali mwielda mejtin,

▼M5

— Dejta dwar il-piż tal-boton u l-piż tal-frieħ (irġiel, nisa u f'daqqa), in-numru ta' annimali li baqgħu żgħar jekk determinat,

— In-numru ta' frieħ b'anormalitajiet ferm viżibbli,

— Effetti tossiċi jew oħrajn fuq l-ulied, it-tkabbir wara t-twelid, il-vijabbiltà, eċċ.,

— Dejta dwar punti ta' riferiment fiżiċi fi frieħ u dejta oħra dwar l-iżvilupp wara t-twelid,

— Dejta dwar il-maturità sesswali ta' annimali F_1,

— Dejta dwar osservazzjonijiet funzjonali fi frieħ u adulti, skont kif appilkabbli,

— Il-piż tal-ġisem fis-sagrifiċċju u dejta dwar il-piż tal-organi relattiv u assolut għal annimali P u annimali adulti F_1,

— Is-sejbiet fin-nekropsija,

— Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi kollha,

— In-numru totali ta' sperma epididimali cauda, il-perċentwal ta' sperma progressivament motili, il-perċentwal ta' sperma morfoloġikament normali, u l-perċentwal ta' sperma b'kull anormalità identifikata għal irġiel P u F_1,

— In-numri u l-istadji tal-maturità tal-follikoli li jinsabu fl-ovarji tan-nisa P u F_1, fejn applikabbli,

— Enumerazzjoni tal-corpora lutea fl-ovarji tan-nisa F_1,

— Trattament statistiku tar-riżultati, fejn xieraq.

Parametri tal-koorta 2:

— Deskrizzjoni dettaljata tal-proċeduri użati biex jiġu standardizzati osservazzjonijiet u proċeduri kif ukoll definizzjonijiet operazzjonali għall-għoti ta' punteġġ għall-osservazzjonijiet,

— Lista tal-proċeduri kollha tat-test użati, u ġustifikazzjoni għall-użu tagħhom,

— Dettalji tal-proċeduri tal-imġiba/funzjonali, newropatoloġiċi u morfometriċi użati, inkluża informazzjoni u dettalji dwar apparati awtomatizzati,

— Proċeduri għall-kalibraġġ u l-iżgurar tal-ekwivalenza tal-apparati u l-ibbilanċjar tal-gruppi tal-kura fil-proċeduri ta' ttestjar,

— Ġustifikazzjoni qasira li tispjega kwalunkwe deċiżjoni li tinvolvi ġudizzju professjonali,

— Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha dwar l-imġiba/funzjonali, newropatoloġiċi u morfometriċi skont is-sess u l-grupp tad-doża, inklużi kemm żidiet kif ukoll tnaqqisiet mill-kontrolli,

— Il-piż tal-moħħ,

— Kwalunkwe dijanjosi li ġejja minn sinjali newroloġiċi u leżjonijiet, inkluż mard jew kundizzjonijiet li jseħħu b'mod naturali,

— Stampi ta' sejbiet eżemplari,

— Stampi b'enerġija baxxa biex tiġi vvalutata l-omoloġija tas-sezzjonijiet użati għall-morfometrija,

▼M5

— Trattament statistiku tar-riżultati, inklużi l-mudelli statistiċi użati biex tiġi analizzata d-dejta, r-riżultati, indipendentement minn jekk kinux sinifikanti jew le,

— Ir-relazzjoni ta' kwalunkwe effett tossiku ieħor ma' konklużjoni dwar il-potenzjal newrotossiku tas-sustanza kimika tat-test, skont is-sess u l-grupp tad-doża,

— L-impatt ta' kwalunkwe informazzjoni tossikokinetika fuq il-konklużjonijiet,

— Dejta li ssostni l-affidabbiltà u s-sensittività tal-metodu ta' ttestjar (jiġifieri dejta tal-kontroll pożittiv u storiku),

— Ir-relazzjonijiet, jekk jeżistu, bejn l-effetti newropatoloġiċi u funzjonali,

— L-NOAEL jew id-doża ta' riferiment għal ommijiet u wlied, skont is-sess u l-grupp tad-doża,

— Diskussjoni tal-interpretazzjoni ġenerali tad-dejta fuq il-bażi tar-riżultati, inkluża konklużjoni dwar jekk is-sustanza kimika kkaġunatx newrotossiċità tal-iżvilupp u l-NOAEL.

Parametri tal-koorta 3:

— Titri tal-antikorp IgM tas-serum (sensitizzazzjoni għal SRBC jew KLH), jew unitajiet PFC IgM tal-milsa (sensitizzazzjoni għal SRBC);

— It-twettiq tal-metodu TDAR għandu jkun ikkonfermat bħala parti mill-proċess ta' ottimizzazzjoni mil-laboratorju li jħejji l-assaġġ għall-ewwel darba, u b'mod perjodiku (eż. kull sena) mil-laboratorji kollha;

— Diskussjoni tal-interpretazzjoni ġenerali tad-dejta fuq il-bażi tar-riżultati, inkluża konklużjoni dwar jekk is-sustanza kimika kkaġunatx immunotossiċità tal-iżvilupp u l-NOAEL;

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet, inklużi l-valuri tal-NOAEL għal effetti fuq il-ġenituri u l-ulied

Għandha tiġi pprovduta wkoll l-informazzjoni kollha mhux miksuba matul l-istudju, iżda li hija utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati (eż., similaritajiet tal-effetti għal kwalunkwe newrotossikant magħruf).

Interpretazzjoni tar-Riżultati

80. Studju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Waħda ser jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' esponiment ripetut għal sustanza kimika matul il-fażijiet kollha taċ-ċiklu riproduttiv, kif ikun hemm bżonn. B'mod partikolari, l-istudju jipprovdi informazzjoni dwar is-sistema riproduttiva, u dwar l-iżvilupp, it-tkabbir, is-sopravvivenza u l-punti aħħarin funzjonali tal-ulied sal-PND 90.

81. L-interpretazzjoni tar-riżultati tal-istudju għandhom jieħdu f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni dwar is-sustanza kimika, inklużi proprjetajiet fiżikokimiċi, tat-TK u tossikodinamiċi, l-informazzjoni rilevanti disponibbli dwar analogi strutturali, u riżultati ta' studji dwar it-tossiċità li saru qabel bis-sustanza kimika tat-test (eż., tossiċità akuta, tossiċità wara applikazzjoni ripetuta, studji mekkanistiċi u studji li jivvalutaw jekk hemmx differenzi kwalitattivi u kwantitattivi sostanzjali bejn l-ispeċi fi proprjetajiet metaboliċi *in vivo*/*in vitro*). Ir-riżultati tan-nekropsija grossa u tal-piż tal-organi għandhom jiġu vvalutati fil-kuntest ma' osservazzjonijiet li jsiru fi studji oħrajn b'doża ripetuta, meta dan ikun fattibbli. It-tnaqqisiet fit-tkabbir tal-ulied jistgħu jitqiesu f'relazzjoni ma' influwenza tas-sustanza kimika tat-test fuq il-kompożizzjoni tal-ħalib (29).

▼M5

Koorta 2 (Newrotossiċità tal-iżvilupp)

82. Ir-riżultati tan-newromġiba u n-newropatoloġija għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tas-sejbiet kollha, billi jintuża approċċ tal-piż tal-evidenza b'ġudizzju espert. Għandhom jiġu diskussi l-mudelli tas-sejbiet tal-imġiba jew morfoloġiċi, jekk ikunu preżenti, kif ukoll evidenza tar-rispons għad-doża. L-evalwazzjoni tan-newrotossiċità tal-iżvilupp, inklużi studji epidemjoloġiċi tal-bniedem jew rapporti tal-każ, u studji sperimentali ta' annimali (eż. dejta tossikokinetika, informazzjoni dwar l-istruttura-attività, dejta minn studji oħrajn tat-tossiċità) għandha tkun inkluża f'din il-karatterizzazzjoni. Evalwazzjoni tad-dejta għandha tinkludi diskussjoni kemm tal-importanza bijoloġika kif ukoll statistika. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni, jekk ikun hemm waħda, bejn l-alterazzjonijiet newropatoloġiċi u tal-imġiba osservati. Għal gwida dwar l-interpretazzjoni tar-riżultati tan-newrotossiċità tal-iżvilupp, irreferi għall-metodu ta' ttestjar B.53 (35) u Tyl et al., 2008 (31).

Koorta 3 (Immunotossiċità tal-iżvilupp)

83. Trażżin jew tisħiħ tal-funzjoni immuni kif ivvalutata bit-TDAR (rispons tal-antikorpi li jiddependu fuq iċ-ċelloli T), għandhom jiġu evalwati fil-kuntest tal-osservazzjonijiet kollha li jkunu saru. Is-sinifikanza tal-eżitu tat-TDAR tista' tkun sostnuta b'effetti oħrajn fuq indikaturi relatati immunoloġikament (eż., ċellolarità tal-mudullun tal-għadam, il-piż u l-ispatoloġija tat-tessuti limfojdi, id-distribuzzjoni tas-sottosett tal-limfoċite). L-effetti stabbiliti bit-TDAR jistgħu jkunu inqas sinifikanti f'każ ta' tossiċitajiet oħrajn osservati f'konċentrazzjonijiet iżgħar ta' esponiment.

84. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 għandu jiġi kkonsultat għal għajnuna fl-interpetazzjoni tar-riżultati dwar ir-riproduzzjoni u n-newrotossiċità (26).

TAGĦRIF

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

▼**M5**

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.

(9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408-415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383-390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298-303.

(14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9-19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23-35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103-107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39-44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.

▼**M5**

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Kompjuter-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401-415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.

(26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Pariġi.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330-337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717-1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.

(32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, Linja Gwida tal-OECD għall-Ittestjar ta' Sustanzi Kimiċi, Nru 422, OECD, Pariġi.

(33) Il-Kapitolu B.43 ta' dan l-Anness, Studju tan-Newrotossiċità fir-Rodituri

(34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Pariġi.

(35) Il-Kapitolu B.53 ta' dan l-Anness, Studju tan-Newrotossiċità tal-Iżvilupp

(36) Il-Kapitolu B.54 ta' dan l-Anness, Bijoassaġġ Uterotrofiku fir-Rodituri: Test ta' Tgħarbil fuq terminu qasir għal Proprjetajiet Estroġeniċi

(37) Il-Kapitolu B.55 ta' dan l-Anness, Il-Bijoassaġġ Hershberger fil-Firien: Assaġġ ta' Tgħarbil fuq Terminu Qasir għal Proprjetajiet (Anti)Androġeniċi

▼**M5**

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Pariġi.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Kanada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Pariġi.

(40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Pariġi.

▼**M5**

Appendiċi 1

Miżuri u osservazzjonijiet inkludi fil-batterija osservazzjonali funzjonali (Koorta 2A)

Gaġġa ta' Oriġini u fil-Berah	Manipolattivi	Fiżjoloġiċi
Pożizzjoni	Faċilità ta' tneħħija	Temperatura
Kloniċi u Toniċi Involuntarji	Faċilità ta' tqandil	Piż tal-ġisem
Għeluq tal-Kappell tal-Għajn	Ton tal-Muskolu	Rispons tal-ħabba
Piloerezzjoni	Rispons għall-Viċinanza	Daqs tal-ħabba
Salivazzjoni	Rispons għall-Mess	
Dmugħ	Rispons Awditorju	
Tleħħin	Rispons għal Qarsa tad-Denb	
Qawmien f'pożizzjoni wieqfa	Rispons għal Qawmien f'Pożizzjoni Dritta	
Anormalitajiet fil-mixja	Ftuħ tas-Sieq ta' Nżul	
Koxjenza	Saħħa fl-Għalfsa tas-Sieq ta' Quddiem	
Sterjotipija	Saħħa fl-Għalfsa tas-Sieq ta' Wara	
Imġiba Stramba		
Razez		
Anormalitajiet fit-Teħid tan-Nifs		

▼**M5**

Appendiċi 2

DEFINIZZJONIJIET:

Sustanza Kimika: Sustanza jew taħlita.

Sustanza Kimika tat-Test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M5

B.57. **H295R ASSAĠĠ TAL-ISTEROJDOĠENESI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar it-Testijiet (TG) tal-OECD Nru 456 (2011). Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi linji gwida dwar it-testijiet eżistenti, u tiżviluppa ġodda, għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali. Il-Qafas Kunċenttwali tal-2002 tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi Interferenti Endokrinali jinvolvi ħames livelli, b'kull livell li jikkorrispondi għal livell differenti ta' kumplessità bijoloġika (1). L-Assaġġ tal-Isterojdoġenesi *in vitro* H295R (H295R) deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar juża linja ta' ċelloli adrenokarċinoma tal-bniedem (ċelloli NCI-H295R) u jikkostitwixxi "assaġġ *in vitro* tat-2 livell, li jipprovdi dejta mekkanistika", li għandu jintuża għal finijiet ta' tgħarbil u prijoritizzazzjoni. L-iżvilupp u l-istandardizzazzjoni tal-assaġġ bħala tgħarbil għal effetti kimiċi fuq sterojdoġenesi, speċifikament il-produzzjoni ta' 17β-estradjol (E2) u testosteron (T), twettqu fi proċess b'bosta stadji. L-assaġġ H295R ġie ottimizzat u vvalidat (2)(3)(4)(5).

2. L-għan tal-Assaġġ tal-Isterojdoġenesi H295R huwa li jidentifika sustanzi kimiċi li jaffettwaw il-produzzjoni ta' E2 u T. L-assaġġ H295R huwa maħsub sabiex jidentifika ksenobijotiċi li bħala s-sit(i) fil-mira tagħhom għandhom il-komponenti endoġeni li jinvolvu l-mogħdija bijokimika intraċellolari li tibda bis-sekwenza ta' reazzjonijiet mill-kolesterol sal-produzzjoni ta' E2 u/jew T. L-assaġġ H295R mhuwiex maħsub sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jaffettwaw l-isterojdoġenesi minħabba effetti fuq l-assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG). L-għan tal-assaġġ huwa li jipprovdi tweġiba IVA/LE fir-rigward tal-potenzjal ta' sustanza kimika li tikkaġuna jew tinibixxi l-produzzjoni ta' T u E2; madankollu, jistgħu jinkisbu riżultati kwantitattivi f'ċerti każijiet (ara l-paragrafi 53 u 54). Ir-riżultati tal-assaġġ jingħataw bħala bidliet relattivi fil-produzzjoni tal-ormini meta mqabbla mal-kontrolli ta' solventi (SCs). L-assaġġ ma għandux l-għan li jipprovdi informazzjoni mekkanistika speċifika dwar l-interazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mas-sistema endokrinali. Saret riċerka billi ntużat il-linja ta' ċelloli ħalli jiġu identifikati effetti fuq enżimi speċifiċi u ormoni intermedjati bħall-proġesteron (2).

3. Id-definizzjonijiet u t-taqsiriet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi. Protokoll dettaljat inkluži struzzjonijiet dwar kif tipprepara soluzzjonijiet, tikkultiva ċelloli u twettaq diversi aspetti tat-test huwa disponibbli bħala Appendiċi I-III tad-dokument tal-OECD 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (4).

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

4. Ħames enżimi differenti li jikkaġunaw sitt reazzjonijiet differenti huma involuti f'bijosinteži tal-ormon tal-isterojdi tas-sess. Il-konverżjoni enżimatika tal-kolesterol għal pregnenolon miċ-ċitokromu P450 (CYP) enżima kolsterol monossiġenasi li jaqtal-katina laterali (CYP11 A) jikkostitwixxi l-pass inizjali f'serje ta' reazzjonijiet bijokimiċi li jwasslu għal sinteži tal-prodotti finali tal-isterojdi. Skont l-ordni taż-żewġ reazzjonijiet ta' wara, il-mogħdija sterojdoġenika tinqasam f'żewġ mogħdijiet, il-mogħdija idrossisterojdi Δ^5 u l-mogħdija ketosterojdi Δ^4, li jiltaqgħu fil-produzzjoni tal-androstenedjon (Figura 1).

5. Androstenedjon huwa konvertit f'testosteron (T) minn 17β-idrossisterojd deidroġenasi (17β-HSD). It-testosteron huwa kemm prodott intermedjat kif ukoll ormon tal-prodott finali. Fir-raġel, T jista' jiġi konvertit f'diidrotestosteron (DHT) permezz ta' 5α-ridottasi, li tinsab fil-membrani ċellolari, envelopp nukleari, u retikulu endoplażmiku tat-tessuti fil-mira ta' azzjoni androġenika bħall-prostata u n-nuffati seminali. DHT huwa notevolment iktar qawwi bħala androġen milli T u jitqies li huwa ormon tal-prodott finali wkoll. L-assaġġ H295R ma jkejjilx id-DHT (ara l-paragrafu 10).

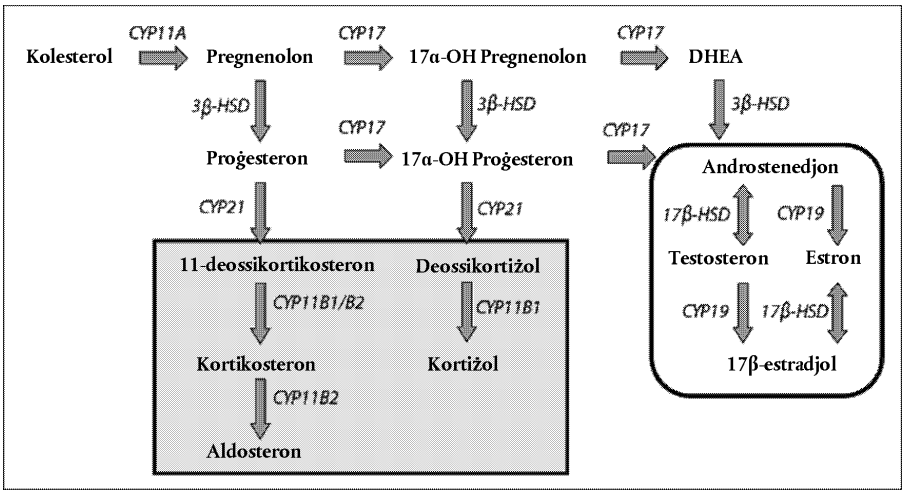
▼M5

6. L-enżima fil-mogħdija sterojdoġenika li tikkonverti sustanzi kimiċi androġeniċi f'sustanzi kimiċi estroġeniċi hija aromataži (CYP19). CYP19 tibdel T f'17β-estradjol (E2) u androstenedjon f'estron. E2 u T jitqiesu ormoni tal-prodott finali tal-mogħdija sterojdoġenika.

7. L-ispeċifiċità tal-attività tal-ljasi ta' CYP17 tvarja għas-sottostrati intermedjati bejn l-ispeċi. Fil-bniedem, l-enżina tiffavorixxi sottostrati tal-mogħdija idrossisterojdi Δ^5 (pregnenolon), filwaqt li sottostrati fil-mogħdija ketosterojdi Δ^6 (proġesteron) huma ffavoriti fil-far (19). Dawn id-differenzi fl-attività tal-ljasi ta' CYP17 jistgħu jispjegaw uħud mid-differenzi li jiddependu fuq l-ispeċi bħala rispons għal sustanzi kimiċi li jibdlu l-isterojdoġenesi *in vivo* (6). Intwera li ċ-ċelloli H295 jirriflettu l-iktar mill-qrib l-espressjoni tal-enżima adrenali u l-mudell ta' produzzjoni tal-isterojdi ta' bniedem adult (20), iżda huma magħrufin li jesprimu enżimi kemm għall-mogħdija idrossisterojdi Δ^5 kif ukoll dik ketosterojdi Δ^6 għas-sinteżi tal-androġen (7)(11)(13)(15).

Figura 1

Mogħdija sterojdoġenika f'ċelloli H295R



Nota:

L-enżimi huma fil-korsiv, l-ormoni huma skurati u l-vleġeġ jindikaw id-direzzjoni tas-sinteżi. L-isfond griż jindika mogħdijiet/prodotti kortikosterojdi. Il-mogħdijiet/prodotti sterojdi tas-sess għandhom ċirku madwarhom. CYP = ċitokroma P450; HSD = idrossisterojdi deidroġenasi; DHEA = deidroepjandrosteron.

8. Il-linja ta' ċelloli adreno-karċinoma H295R tal-bniedem hija mudell *in vitro* utli għall-investigazzjoni tal-effetti fuq sinteżi tal-ormon sterojde (2)(7)(8)(9)(10). Il-linja ta' ċelloli H295R tesprimi ġeni li jikkodifikaw għall-enżimi ewlenin kollha għall-isterojdoġenesi osservata iktar 'il fuq (11)(15) (Figura 1). Din hija proprjetà unika għaliex l-espressjoni *in vivo* ta' dawn il-ġeni hija speċifika għat-tessut u l-istadju tal-iżvilupp b'tipikament ebda tessut waħdu jew stadju tal-iżvilupp waħdu li jesprimi l-ġeni kollha involuti fl-isterojdoġenesi (2). Iċ-ċelloli H295R għandhom karatteristiċi fiżjoloġiċi ta' ċelloli adrenali ta' fetu tal-bniedem żonalment mhux differenzjati (11). Iċ-ċelloli jirrappreżentaw sistema *in vitro* unika peress li għandhom il-ħila li jiproduċu l-ormoni sterojdi kollha fil-kortiċi adrenali adult u l-gonadi, biex b'hekk ikun jista' jsir ittestjar għal effetti kemm fuq sinteżi kortikosterojdi kif ukoll fuq il-produzzjoni tal-ormoni tal-isterojdi tas-sess bħal androġeni u estroġeni, għad li l-assaġġ kien validat biss biex

▼**M5**

jidentifika bidliet fit-T u E2. Il-bidliet irreġistrati mis-sistema tat-test fil-forma ta' bidla fil-produzzjoni ta' T u E2 jistgħu jkunu ir-riżultat ta' firxa ta' interazzjonijiet differenti tas-sustanzi kimiċi tat-test b'funzjonijiet sterojdoġeniċi li huma espressi miċ-ċelloli H295R. Dawn jinkludu l-modulazzjoni tal-espressjoni, sinteżi jew funzjoni ta' enżimi involuti fil-produzzjoni, it-trasformazzjoni, jew l-eliminazzjoni ta' ormoni ta' sterojdi (12)(13)(14). L-inibizzjoni tal-produzzjoni ta' ormoni tista' tkun dovuta għal tagħqid kompetittiv dirett ma' enżema fil-mogħdija, impatt fuq kofatturi bħall-NADPH (Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat) u cAMP (Adenożina Monofosfat ċiklika), u/jew żieda fil-metaboliżmu tal-isterojdi jew it-trażżin tal-espressjoni tal-ġeni ta' ċerti enżimi fil-mogħdija tal-isterojdoġenesi. Filwaqt li l-inibizzjoni tista' tkun funzjoni kemm ta' proċessi diretti kif ukoll indetti involuti fil-produzzjoni ta' ormoni, normalment l-induzzjoni tkun ta' għamla indiretta, bħal permezz tal-effett fuq kofatturi bħall-NADPH u s-cAMP (bħal fil-każ ta' forskolin), tnaqqis fil-metaboliżmu tal-isterojdi (13), u/jew sopraregolamentazzjoni tal-espressjoni tal-ġeni sterojdoġeniċi.

9. L-assaġġ H295R għandu bosta vantaġġi:

— Jippermetti li jiġu identifikat kemm żidiet kif ukoll tnaqqisijiet fil-produzzjoni ta' T kif ukoll E2,

— Jippermetti li ssir valutazzjoni diretta tal-impatt potenzjali ta' sustanza kimika fuq il-vijabbiltà/iċ-ċitotossiċità taċ-ċelloli. Din hija karatteristika importanti peress li b'hekk tkun tista' ssir diskriminazzjoni bejn l-effetti li huma dovuti għal ċitotossiċità minn dawk dovuti għall-interazzjoni diretta tas-sustanzi kimiċi mal-mogħdijiet sterojdoġeniċi, li mhijiex possibbli f'sistemi ta' espjanti tat-tessut li jikkonsisti f'diversi tipi ta' ċelloli b'sensittivitajiet u funzjonalitajiet varji,

— Ma jeħtieġx l-użu ta' annimali,

— Il-linja ta' ċelloli ta' H295R hija disponibbli b'mod kummerċjali.

10. Il-limitazzjonijiet ewlenin tal-assaġġ huma kif ġej:

— Il-kapaċità metabolika tiegħu mhijiex magħrufa iżda aktarx kemxejn limitata; b'hekk, sustanzi kimiċi li jeħtieġu jkunu metabolikament attivi aktarx li mhux ser jinstabu f'dan l-assaġġ.

— Peress li ġej mit-tessut adrenali, H295R fih l-enżimi li kapaċi jipproduċu l-glukokortikojdi u l-mineralkortikojdi kif ukoll l-ormoni tas-sess; għalhekk, l-effetti fuq il-produzzjoni ta' glukokortikojdi u mineralkortikojdi jistgħu jinfluwenzaw il-livelli ta' T u E2 osservati fl-assaġġ,

— Ma jkejjilx DHT u, għalhekk, ma jkunx mistenni jsib sustanzi kimiċi li jinibixxu 5α-ridottasi, f'liema każ jista' jintuża l-assaġġ Hershberger (16),

— L-assaġġ H295R mhuwiex ser jidentifika sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-isterojdoġenesi billi jaffettwaw l-assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG) peress li dan jista' jkun studjat biss f'annimali sħaħ.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

11. L-iskop tal-assaġġ huwa l-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi li jaffettwaw il-produzzjoni ta' T u E2. T huwa wkoll intermedju fil-mogħdija għall-produzzjoni ta' E2. L-assaġġ jista' jidentifika sustanzi kimiċi li tipikament jinibixxu jew jinduċu l-enżimi tal-mogħdija tal-isterojdoġenesi.

▼M5

12. Normalment l-assaġġ isir f'kundizzjonijiet standard tal-koltura taċ-ċelloli fi platti tal-koltura b'24 toqba. Inkella, jistgħu jintużaw daqsijiet oħrajn tal-platti għat-twettiq tal-assaġġ; madankollu, kundizzjonijiet taż-żriegħ u sperimentali għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex tinżamm aderenza mal-kriterji tal-prestazzjoni.

13. Wara perjodu ta' akklimatizzazzjoni ta' 24 siegħa fi platti b'bosta toqob, iċ-ċelloli jiġu esposti għal 48 siegħa għal seba' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'tal-inqas tripilikat. Solvent u inibitur u induttur magħruf tal-produzzjoni tal-ormoni jintużaw b'konċentrazzjoni fissa bħala kontrolli negattivi u pożittivi. Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, il-midjum jitneħħa minn kull toqba. Il-varjabbiltà taċ-ċelloli f'kull toqba tiġi analizzata eżatt wara t-tneħħija tal-midjum. Il-konċentrazzjonijiet tal-ormoni fil-midjum jistgħu jitkejlu permezz ta' firxa ta' metodi inklużi kits ta' kejl tal-ormoni kummerċjalment disponibbli u/jew tekniki strumentali bħal spettrometrija tal-massa tal-kromatografija likwida (LC-MS). Id-dejta tingħata bħala bidla fid-daqs relatata mal-kontroll tas-solvent u l-Inqas Konċentrazzjoni b'Effett Osservata (LOEC). Jekk l-assaġġ ikun negattiv, l-ogħla konċenetrazzjoni ttestjata tiġi rrapportata bħala l-Konċentrazzjoni bl-Ebda Effett Osservat (NOEC). Konklużjonijiet dwar il-ħila ta' sustanza kimika biex taffettwa l-isterojdoġenesi għandhom ikunu bbażati fuq tal-inqas żewġ testijiet indipendenti. L-ewwel test jista' jaħdem bħala test ta' sejbien tal-medda b'aġġustament sussegwenti tal-konċentrazzjonijiet għat-testijiet 2 u 3, jekk applikabbli, jekk jinstabu problemi relatati mas-solubilità jew iċ-ċitotossiċità jew jekk l-attività tas-sustanza kimika tkun tidher li waslet fi tmiem il-medda tal-konċentrazzjonijiet ittestjati.

PROĊEDURA TAL-KOLTURA

Linja Ċellolari

14. Iċ-ċelloli NCI-H295R huma kummerċjalment disponibbli mill-American Type Culture Collections (ATCC) wara li jiġi ffirmat Material Transfer Agreement (MTA) [1].

Introduzzjoni

15. Minħabba bidliet fil-kapaċità ta' produzzjoni ta' E2 taċ-ċelloli b'età/mogħdija li jikbru (2), iċ-ċelloli għandhom ikunu kolturati wara protokoll speċifiku qabel jintużaw u għandha tittieħed nota tan-numru ta' mogħdijiet mindu ċ-ċelloli tneħħew mill-friża kif ukoll in-numru tal-mogħdjia li fiha ġew iffriżati ċ-ċelloli u tqiegħdu f'ħażna tan-nitroġenu likwidu. L-ewwel numru jindika n-numru tal-mogħdija propja taċ-ċellola u t-tieni numru jiddeskrivi n-numru tal-mogħdija li fiha ċ-ċelloli ġew iffriżati u tqiegħdu għall-ħżin. Pereżempju, ċelloli li kienu ffriżati wara l-ħames moħdija u tneħħew mill-friża u mbagħad inqasmu tliet darbiet (4 mogħdijiet jekk iċ-ċelloli maħlul frisk jingħaddu bħala l-1 mogħdija) wara li ġew ikkolturati mill-ġdid jitniżżlu bħala l-mogħdija 4.5. Eżempju ta' skema ta' enumerar hija rappreżentata fl-Appendiċi I tar-rapport ta' validazzjoni (4).

16. Midjum tal-ħażna jintuża bħala l-bażi għall-midjums supplimentati u tal-iffriżar. Il-midjum supplimentat huwa komponent neċessarju għall-koltura taċ-ċelloli. Il-midjum tal-iffriżar huwa mfassal b'mod speċifiku biex ikun jista' jsir iffriżar ħieles minn impatti taċ-ċelloli għal ħżin fit-tul. Qabel l-użu, Nu-serum (jew serum komparabbli bi proprjetajiet indaqs li ntwera li jipproduċi dejta li tissodisfa l-prestazzjoni tat-test u r-rekwiżiti ta' Kontroll tal-Kwalità (QC)), li huwa kostitwent ta' midjums supplimentati, għandu jiġi analizzat għal konċentrazzjonijiet ta' sfond ta' T u E2. Il-preparazzjoni ta' dawn is-soluzzjonijiet hija deskritta fl-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4).

[1] ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Wara l-bidu tal-koltura ta' ċellola H295R minn lott oriġinali tal-ATCC, iċ-ċelloli għandhom jitkabbru għal ħames mogħdijiet (jiġifieri ċ-ċelloli jinqasmu 4 darbiet). Imbagħad, iċ-ċelloli tal-ħames mogħdija jiġu ffriżati f'nitroġenu likwidu għall-ħżin. Qabel l-iffriżar taċ-ċelloli, fi platt tal-QC isir kampjun taċ-ċelloli tar-raba' mogħdija preċedenti (Ara l-paragrafu 36 u 37) biex jiġi verifikat jekk il-produzzjoni bażi tal-ormoni u r-rispons għal sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv jissodisfawx il-kriterji ta' kontroll tal-kwalità tal-assaġġ kif definiti fit-Tabella 5.

18. Iċ-ċelloli H295R iridu jiġu kkolturati, iffriżati u jinħażnu f'nitroġenu likwidu biex jiġi żgurat li dejjemm ikun hemm ċelloli tal-mogħdija/età xierqa disponibbli għal koltura u użu. In-numru massimu ta' mogħdijiet wara li jittieħed lott ġdid ([1]) jew iffriżat ([2]) ta' ċelloli f'koltura li huwa aċċettabbli għall-użu fl-assaġġ H295R ma għandux jaqbeż l-10. Pereżempju, il-mogħdijiet aċċettabbli għall-kolturi ta' ċelloli minn lott iffriżat fil-mogħdija 5 ikun minn 4.5 sa 10.5. Għal ċelloli li jinbdew minn dawn il-lottijiet iffriżati, għandha tiġi segwita l-proċedura deskritta fil-paragrafu 19. Dawn iċ-ċelloli għandhom jiġu kkolturati għa tal-inqas erba' (4) mogħdijiet addizzjonali (mogħdija 4.5) qabel ma jintużaw fl-ittestjar.

Ċelloli tal-Bidu mill-Ħażna Ffriżata

19. Il-proċedura għall-bidu taċ-ċelloli minn ħażna ffriżata għandha tintuża meta lott ġdid ta' ċelloli jitneħħa mill-ħżin f'nitroġenu likwidu għall-fini ta' koltura u ttestjar. Id-dettalji għal din il-proċedura huma stabbiliti fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4). Iċ-ċelloli jitneħħew minn ħażna f'nitroġenu likwidu, jinħallu malajr, jitqiegħdu f'midjum supplimentat f'tubu ċentrifugu f'temperatura ambjentali, jerġgħu jiġu sospiżi f'midjum supplimentat, u jiġu ttrasferiti fi flask tal-koltura. Il-midjum għandu jinbidel l-għada. Iċ-ċelloli H295R huma kolativati f'inkubatur f'37 °C b'5 % CO_2 f'atmosfera tal-arja u l-midjum jinbidel 2-3 darbiet fil-ġimgħa. Meta ċ-ċelloli jkunu madwar 85-90 % konfluwenti, għandhom jinqasmu. Il-qsim taċ-ċelloli huwa neċessarju biex jiġu żgurati s-saħħa u t-tkabbir taċ-ċelloli u sabiex jinżammu ċelloli għat-twettiq ta' bijoassaġġi. Iċ-ċelloli jitlaħalħu tliet darbiet b'salmastru b'bafer tal-fosfat (PBS, bla Ca^{2+} Mg^{2+}) u jitneħħew mill-flask tal-koltura billi tiżdied enżima xierqa ta' qlugħ, eż., tripsina, f'PBS (bla Ca^{2+} Mg^{2+}). Eżatt wara li ċ-ċelloli jinqalgħu mill-flask tal-koltura, l-azzjoni tal-enżima għandha titwaqqaf billi jiżdied il-midjum supplimentat bi proporzjon ta' 3X il-volum użat għat-trattament bl-enżima. Iċ-ċelloli jitqiegħdu f'tubu ċentrifugu, jiġu ċentrifugati f'temperatura ambjentali, is-supernatant jitneħħa u l-pellet ta' ċelloli jerġa' jiġi sospiż f'midjum supplimentat. L-ammont xieraq ta' soluzzjoni taċ-ċellola jitqiegħed fil-flask il-ġdid tal-koltura. L-ammont ta' soluzzjoni taċ-ċellola għandu jiġi aġġustat sabiex iċ-ċelloli jkunu konfluwenti fi żmien 5-7 ijiem. Il-proporzjon sottokultivat rakkomandat huwa 1:3 sa 1:4. Il-platt għandu jiġi mmarkat bir-reqqa. Iċ-ċelloli issa lseti biex jintużaw fl-assaġġ u ċ-ċelloli żejda għandhom jiġu ffriżati f'nitroġenu likwidu kif spjegat fil-paragrafu 20.

([1]) "Lott ġdid" tirreferi għal lott fjamant ta' ċelloli riċevut mill-ATCC.

([2]) "Lott iffriżat" tirreferi għal ċelloli li ġew ikkolturati qabel u mbagħad ġew iffriżati f'laboratorju ieħor li mhuwiex l-ATCC.

▼M5

Iffriżar ta' Ċelloli H295R (preparazzjoni ta' ċelloli għal ħżin f'nitroġenu likwidu)

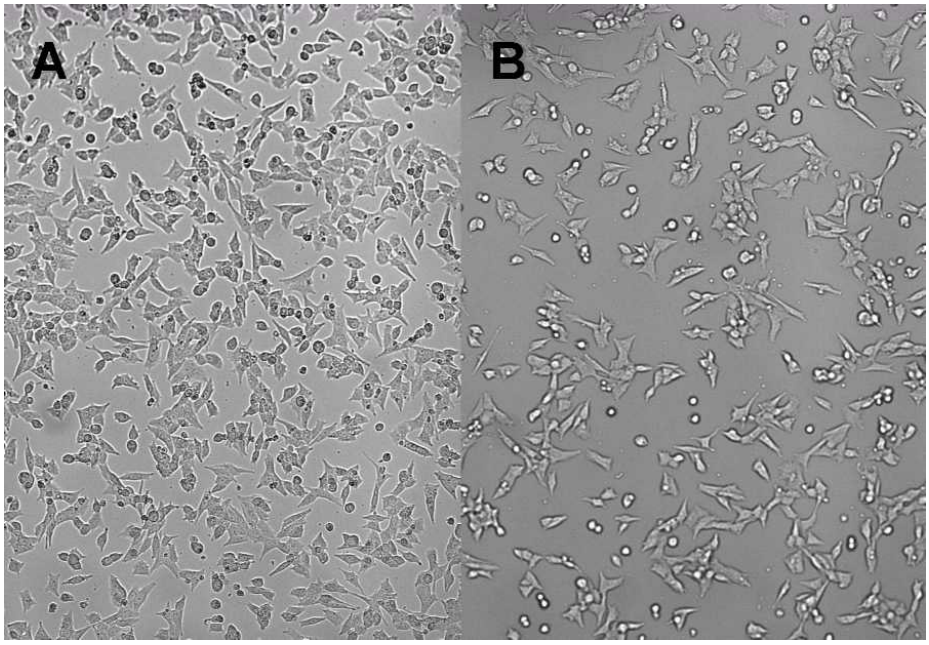
20. Biex jiġu ppreparati ċelloli H295R għall-iffriżar, il-proċedura deskritta hawn fuq għall-qsim taċ-ċelloli għandha tiġi segwita sal-istadju ta' sospensjoni mill-ġdid tal-pellet taċ-ċelloli f'qiegħ it-tubu ċentrifugu. Hawnhekk, il-pellet taċ-ċelloli jerġa' jiġi sospiż f'midjum ta' ffriżar. Is-soluzzjoni tiġi ttrasferita f'kunjett krijoġeniku, immarkata kif xieraq, u ffriżata f'– 80 °C għal 24 siegħa u wara l-kunjett krijoġeniku jiġi ttrasferit f'nitroġenu likwidu għall-ħżin. Id-dettalji għal din il-proċedura huma stabbiliti fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4).

Tqegħid fil-Platti u Preinkubazzjoni ta' Ċelloli għall-Ittestjar

21. In-numru ta' platti b'24 toqba, ippreparati kif spjegat fil-paragrafu 19, li ser ikunu meħtieġa skont in-numru ta' sustanzi kimiċi li għandom jiġu ttestjati u l-konfluwenza taċ-ċelloli fil-platti tal-koltura. Bħala regola ġenrrali, flask wieħed tal-koltura (75 cm^2) b'ċelloli konfluwenti ta' 80-90 % ser iforni biżżejjed ċelloli għal platt wieħed sa 1,5 (b'24 toqba) b'densità fil-mira ta' 200 000 sa 300 000 ċellola għal kull ml tal-midjum, u dan jirriżulta f'konfluwenza ta' madwar 50-60 % fit-toqob wara 24 siegħa (Figura 2). Tipikament, din hija d-densità ottimali taċ-ċelloli għall-produzzjoni ta' ormoni fl-assaġġ. F'densitajiet ogħla, il-mudelli ta' produzzjoni ta' T kif ukoll E2 jinbidlu. Qabel ma jsir l-assaġġ għall-ewwel darba, huwa rakkomandat li jiġu ttestjati densitajiet ta' żriegħ differenti ta' bejn 200 000 u 300 000 ċellola għal kull ml, u li d-densità li tirriżulta f'konfluwenza ta' 50-60 % fit-toqba wara 24 siegħa tingħażel għal iktar esperimenti.

Figura 2

Fotomikrografija ta' ċelloli H295R b'densità ta' żriegħ ta' 50 % fi platt tal-koltura b'24 toqba meħuda fit-tarf (A) u ċ-ċentru (B) ta' toqba



22. Il-midjum jiġi pipettat mill-flask tal-kultura, u ċ-ċelloli jitlaħalħu 3 darbiet b'PBS sterili (bla $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Tiżdied soluzzjoni ta' enżima (f'PBS) biex taqla' ċ-ċelloli mill-flask tal-koltura. Wara żmien xieraq għall-qlugħ taċ-ċelloli, l-azzjoni tal-enżima għandha titwaqqaf biż-żieda ta' midjum supplimentat bi proprozjon ta' 3X il-volum użat għat-trattament bl-enżima. Iċ-ċelloli jitqiegħdu f'tubu ċentrifugu, ċentrifugati f'temperatura ambjentali, is-supernatant jitneħħa, u l-pellet taċ-ċelloli jerġa' jiġi sospiż f'midjum

▼M5

supplimentat. Id-densità taċ-ċelloli tiġi kkalkolata billi jintużaw, eż., emoċitometru jew kalkolatur taċ-ċelloli. Is-soluzzjoni taċ-ċelloli għandha tiġi dilwita sad-densità mixtieqa tat-tqegħid fil-platt u titħawwad sew biex tiġi żgurata densità omoġena taċ-ċelloli. Iċ-ċelloli għandhom jitqiegħdu fi platt b'1 ml tas-soluzzjoni ta' ċelloli/toqba u l-platti u t-toqob immarkati. Il-platti li fihom isir żrieġħ jiġu inkubati f'37 °C f'5 % CO_2 f'atmosfera tal-ajru għal 24 siegħa biex iċ-ċelloli jkunu jistgħu jaqbdu mat-toqob.

REKWIŻITI TA' KONTROLL TAL-KWALITÀ

23. Huwa kruċjali li l-volumi eżatti tas-soluzzjonijiet u l-kampjuni jitwasslu fit-toqob matul id-dożaġġ għaliex dawn il-volumi jiddeterminaw il-konċentrazzjonijiet użati fil-kalkoli tar-riżultati tal-assaġġ.

24. Qabel il-bidu tal-koltura taċ-ċelloli u kwalunkwe ttestjar sussegwenti, kull laboratorju għandu juri s-sensittività tas-sistema ta' kejl tal-ormoni tagħha (paragrafi 29-31).

25. Jekk ser jintużaw assaġġi ta' kejl tal-ormoni bbażati fuq antikorpi, is-sustanzi kimiċi li ser jiġu ttestjati għandhom jiġu analizzati għall-potenzjal tagħhom li jinterferixxu mas-ssitema ta' kejl użata biex jiġu kwantifikati T u E2 kif spjegat fil-paragrafu 32 qabel jinbeda l-ittestjar.

26. DMSO huwa s-solvent rakkomandat għall-assaġġ. Jekk jintuża solvent alternattiv, għandhom jiġu determinati dawn li ġejjin:

— Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test, il-forskolin u l-prokloraz fis-solvent, u

— Iċ-ċitotossità bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni tas-solvent.

Huwa rakkomandat li l-konċentrazzjoni massima awtorizzabbli tas-solvent ma għandhiex taqbeż 10 × dilwizzjoni tal-inqas konċentrazzjoni ċitotossika tas-solvent.

27. Qabel ma jagħmel it-testijiet għall-ewwel darba, il-laboratorju għandu jagħmel esperiment kwalifikattiv li juri li l-laboratorju kapaċi jżomm u jilħaq il-kundizzjonijiet xierqa meħtieġa tal-koltura taċ-ċelloli u tal-esperimenti għall-ittestjar tas-sustanza kimika kif spjegat fil-paragrafi 33-35.

28. Meta jinbeda l-ittestjar għal lott ġdid, għandu jsir platt tal-kontroll qabel ma jintuża lott ġdid ta' ċelloli ħalli tiġi evalwata l-prestazzjoni taċ-ċelloli kif deskritt fil-paragrafi 36 u 37.

Prestazzjoni tas-Sistema ta' Kejl tal-Ormoni

Sensittività, reqqa, preċiżjoni tal-metodu u l-kontroreattività tiegħu ma' matriċi kampjun

29. Kull laboratorju jista' juża sistema ta' kejl tal-ormoni tal-għażla tiegħu għall-analiżi tal-produzzjoni ta' T u E2 minn ċelloli H295R diment li tissodisfa l-kriterji ta' prestazzjoni, inkluż il-limitu ta' Kwantifikazzjoni (LOQ). Nominalment, dawn huma 100 pg/ml għal T u 10 pg/ml għal E2, li huma bbażati fuq il-livelli ormonali bażi fl-istudji ta' validazzjoni. Madankollu, livelli ogħla jew inqas jistgħu jkunu xierqa skont il-livelli tal-ormoni bażi miksubin fil-laboratorju inkarigat. Qabel ma jsiru l-platti tal-QC u t-testijiet, il-laboratorju għandu juri li l-assaġġ tal-ormon li ser jintuża jista' jkejjel konċentrazzjonijiet tal-ormoni f'midjum supplimentat b'reqqa u preċiżjoni

▼M5

suffiċjenti sabiex jissodisfa l-kriterji tal-QC speċifikati fit-Tabelli 1 u 5 billi jiġi analizzat midjum supplimentat miżjud b'kontroll intern tal-ormoni. Ma' kull midjum supplimentat għandhom jiżdiedu tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet ta' kull ormon (eż., 100, 500 u 2 500 pg/ml T; 10, 50 u 250 pg/ml E2; jew l-inqas konċentrazzjonijiet possibbli fuq il-bażi tal-limiti ta' identifikazzjoni tas-sistema ta' kejl tal-ormoni magħżulin jistgħu jintużaw għall-inqas konċentrazzjonijiet miżjudin għal T u E2) u jiġu analizzati. Konċentrazzjonijiet tal-ormoni mkejlin ta' kampjuni mhux estrattati għandhom ikunu fi ħdan konċentrazzjonijiet nominali ta' 30 %, u l-varjazzjoni ta' bejn il-kejliet replikati tal-istess kampjun ma għandhiex taqbeż il-25 % (ara wkoll it-Tabella 8 għal kriterji addizzjonali tal-QC). Jekk dawn il-kriterji tal-QC jiġu ssodisfati, huwa supponut li l-assaġġ magħżul tal-kejl tal-ormoni huwa eżatt u preċiż biżżejjed u ma jidħolx f'kontroreazzjoni ma' komponenti fil-midjum (matriċi kampjun) b'tali mod li tkun mistennija influwenza importanti fuq l-eżitu tal-assaġġ. F'dan il-każ, ma jkun hemm bżonn li ssir ebda estrazzjoni ta' kampjuni qabel il-kejl tal-ormoni.

30. F'każ li l-kriterji tal-QC fit-tabelli 1 u 8 ma jkunux issodisfati, jista' jkun li qed iseħħ effett matriċi sinifikanti, u għandu jsir esperiment b'midjum miżjud estratt. Eżempju ta' proċedura ta' estrazzjoni huwa deskritt fl-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4). Il-kejliet tal-konċentrazzjonijiet ta' ormini fil-kampjuni estrattati għandhom isiru tliet darbiet ([1]). Jekk jista' jintwera li wara l-estrazzjoni l-komponenti tal-midjum ma jinterferixxux mal-metodu ta' identifikazzjoni tal-orom kif definit mill-kriterji tal-QC, l-esperimenti kollha li jsiru wara għandhom isiru billi jintużaw kampjuni estrattati. Jekk il-kriterji tal-QC ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati wara l-estrazzjoni, is-sistema ta' kejl tal-ormoni użata mhijeix xierqa għall-fini tal-Assaġġ tal-Isterojdoġenesi H295R, u għandu jintuża metodu alternattiva ta' identifikazzjoni tal-ormoni.

Kurva standard

31. Il-konċentrazzjonijiet tal-ormoni tal-kontrolli tas-solvent (SC) għandhom ikunu jaqgħu fi ħdan is-sehem lineari tal-kurva standard. Idealment, il-valuri tal-SC għandhom ikunu jaqgħu ħdejn in-nofs tas-sehem lineari biex jiġi żgurat li l-induzzjoni u l-inibizzjoni tas-sinteżi tal-ormoni jistgħu jitkejlu. Id-dilwizzjonijiet tal-midjum (jew estratti) li għandhom jitkejlu jridu jingħażlu kif xieraq. Ir-reazzjoni lineari trid tiġi determinata permezz ta' approċċ statistiku.

Test tal-interferenza kimika

32. Jekk ser jintużaw assaġġi bbażati fuq antikorpi bħal Assaġġi Immunosorbenti Marbutin mal-Enżimi (ELISAs) u Assaġġi Radjuimmuni (RIAs) biex jitkelju l-ormoni, kull sustanza kimika għandha tiġi ttestjata għal interferenza potenzjali mas-sistema ta' kejl tal-ormoni li ser tintuża qabel jinbeda l-ittestjar propju tas-sustanzi kimiċi (Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4)) għaliex uħud mill-karatteristiċi jistgħu jinterferixxu ma' dawn it-testijiet (17). Jekk isseħħ interferenza li hija ≥ 20 % tal-produzzjoni tal-ormoni bażi għal T u/jew E2 kif determinat mill-analiżi tal-ormoni, it-Test ta' Interferenza tal-Assaġġ tal-Ormoni mas-Sustanza Kimika (kif deskritt fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4) taqsima 5.0) għandu jsir fuq id-dilwizzjonijiet kollha tas-soluzzjonijiet tal-ħażna tas-sustanza kimika tat-test ħalli

([1]) Nota: Jekk ikun hemm bżonn estrazzjonijiet, isiru tliet kejliet identiċi għal kull estratt. Kull kampjun ser jiġi estrattat darba biss.

▼M5

jiġi identifikat id-doża limitu li biha sseħħ interferenza sinifikanti (≥ 20 %). Jekk l-interferenza hija inqas minn 30 %, ir-riżultati jistgħu jiġu kkoreġuti għall-interferenza. Jekk l-interferenza taqbeż it-30 %, id-dejta tkun invalida u għandha titwarrab id-dejta f'dawn il-konċentrazzjonijiet. Jekk isseħħ interferenza sinifikanti ta' sustanza kimika tat-test ma' sistema ta' kejl tal-ormoni f'iktar minn konċentrazzjoni mhux ċitotossika waħda, għandha tintuża sistema differenti ta' kejl tal-ormoni. Sabiex tiġi evitata interferenza minn sustanzi kimiċi kontaminanti, huwa rakkomandat li l-ormoni jiġu estrattati mill-midjum permezz ta' solvent xieraq, il-metodi possibbli jistgħu jinkisbu mir-rapport ta' validazzjoni (4).

Tabella 1

Kriterji ta' prestazzjoni tas-sistemi ta' kejl tal-ormoni

Parametru	Kriterju
Sensittività tal-Metodu ta' Kejl	Limitu tal-Kwantifikazzjoni (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
Effiċjenza tal-Estrazzjoni tal-Ormoni (biss meta jkun hemm bżonn estrazzjoni)	Ir-rati medji ta' rkupru (fuq il-bażi ta' miżuri trippli) għall-ammonti miżjudin tal-ormon ma għandhomx imorru oltre 30 % mill-ammont li żdied.
Interferenza Kimika (sistemi bbażati fuq l-antikorpi biss)	Ma għandha sseħħ ebda kontroreattività sostanzjali (≥ 30 % tal-produzzjoni tal-ormon bażi tal-ormon rappreżentattiv) ma' kwalunkwe wieħed mill-ormoni prodotti miċ-ċelloli ([b]) ([c])

([a]) *Nota*: Il-limiti ta' mmaniġġjar tal-metodi huma bbażati fuq il-valuri ta' produzzjoni tal-ormon bażi pprovduti fit-Tabella 5 u huma bbażati fuq il-prestazzjoni. Jekk tista' tinkiseb produzzjoni ikbar tal-ormon bażi, il-limitu jista' jkun ikbar.

([b]) Ċerti antikorpi ta' T u E2 jistgħu jagħmlu kontroreazzjoni ma' androstendjon u estron, rispettivament, f'perċentwal ogħla. F'dawn il-każijiet, mhuwiex possibbli li jiġu determinati bi preċiżjoni l-effetti fuq 17β-HSD. Madankollu, id-dejta xorta tista' tipprovdi tagħrif utli dwar l-effetti fuq il-produzzjoni ta' estroġen jew androġen inġenerali. F'dawn il-każijiet, id-dejta għandha tingħata bħala risponsi tal-androġen/estroġen flok E2 u T.

([c]) Dawn jinkludu: kolesterol, pregnenolon, proġesteron, 11-deossikortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon,17α-proġesteron, deossikortiżol, kortiżol, DHEA, androstenedjon, estron.

Test tal-Profiċjenza tal-Laboratorju

33. Qabel ma jiġu ttestjati sustanzi kimiċi mhux magħrufin, laboratorju għandu juri li kapaċi jikseb u jżomm kundizzjonijiet xierqa għall-koltura taċ-ċelloli u t-testijiet meħtieġa għat-twettiq b'suċċess tal-assaġġ billi jagħmel test tal-profiċjenza tal-laboratorju. Peress li t-twettiq ta' assaġġ huwa marbut direttament mal-persunal tal-laboratorju li jwettaq l-assaġġ, dawn il-proċeduri għandhom jiġu parzjalment ripetuti jekk isseħħ bidla fil-persunal tal-laboratorju.

34. Dan it-test tal-profiċjenza ser isir fl-istess kundizzjonijiet elenkati fil-paragrafi 38 sa 40 billi ċ-ċelloli jiġu esposti għal 7 konċentrazzjonijiet li jiżdiedu ta' indutturi u inibituri qawwijin, moderati u dgħajfin kif ukoll sustanza kimika negattiva (ara t-Tabella 2). B'mod speċifiku, is-sustanzi kimiku li għandhom jiġu ttestjati jinkludu l-induttur b'saħħtu forskolin (Nru tas-CAS 66575-29-9); l-inibitur b'saħħtu prokloraz (Nru tas-CAS 67747-09-5); l-induttur moderat atrażina (Nru tas-CAS 1912-24-9); l-inibitur moderat aminoglutetimid (Nru tas-CAS 125-84-8); l-induttur dgħajjef (produzzjoni ta' E2) u inibitur dgħajjef (produzzjoni ta' T) bisfenol

▼M5

A (Nru tas-CAS 80-05-7); u l-gonadotropina korjonika umana tas-sustanza kimika negattiva (HCG) (Nru tas-CAS 9002-61-3) kif muri fit-Tabella 2. Isiru platti separati għas-sustanzi kimiċi kollha billi jintuża l-format kif muri fit-Tabella 6. Platt tal-QC minnhom (Tabella 4, paragrafi 36-37) għandu jkun inkluż fit-test ta' kuljum għas-sustanzi kimiċi tal-profiċjenza.

Tabella 2:

Sustanzi kimiċi tal-profiċjenza u konċentrazzjonijiet ta' esponiment

Sustanza kimika tal-profiċjenza	Konċentrazzjonijiet tat-Test [μM]
Prokloraz	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrażina	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimid	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

([a]) Kontroll tas-solvent (DMSO) (0), 1 μl DMSO/toqba

L-esponiment ta' H295R għal sustanzi kimiċi tal-profiċjenza għandha ssir fi platti b'24 toqba matul it-test tal-profiċjenza tal-laboratorju. Id-dożaġġ huwa f'μM għad-dożi kollha tas-sustanza kimika tat-test. Id-dożi għandhom jingħataw f'DMSO b'0,1 % v/v għal kull toqba. Il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test għandhom jiġu ttestjati f'toqob trippli (Tabella 6). Platti separati jiġu ttestjati għal kull sustanza kimika. Platt tal-QC minnhom huwa inkluż ma' kull test ta' kuljum.

35. L-analiżi tal-vijabbiltà taċ-ċellola u tal-ormon għandha ssir kif stipulat fil-paragrafi 42 sa 46. Il-valur limitu (l-inqas konċentrazzjoni b'effett osservata, LOEC) u d-deċiżjoni ta' klassifikazzjoni għandhom jiġu rrapportati u jitqabblu mal-valuri fit-Tabella 3. Id-dejta titqies aċċettabbli jekk tissodisfa l-LOEC u l-klassifikazzjoni tad-deċiżjoni fit-Tabella 3.

Tabella 3:

Valuri limitu (LOECs) u klassifikazzjonijiet tad-deċiżjoni għas-Sustanzi Kimiċi tal-Profiċjenza

	Nru tas-CAS	LOEC [μM]		Klassifikazzjoni tad-Deċiżjoni	
		T	E2	T	E2
Prokloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (Inibizzjoni)	+ (Inibizzjoni)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Induzzjoni)	+ (Induzzjoni)
Atrażina	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Induzzjoni)	+ (Induzzjoni)
Aminoglutetimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inibizzjoni)	+ (Inibizzjoni)

▼M5

	Nru tas-CAS	LOEC [μM]		Klassifikazzjoni tad-Deċiżjoni	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inibizzjoni)	+ (Induzzjoni)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Negattiva	Negattiva

([a]) +, pożittiva
n/a: mhux applikabbli peress li ma għandha sseħħ ebda bidla wara esponiment għal konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi tal-kontroll negattiv.

Platti tal-Kontroll tal-Kwalità

36. Il-platt tal-kontroll tal-kwalità (QC) jintuża biex tiġi verifikata l-prestazzjoni taċ-ċelloli H295R f'kundizzjonijiet standard tal-koltura, u biex tiġi stabbilita database storika għal konċentrazzjonijiet ta' ormoni f'kontrolli solventi, kontrolli pożittivi u negattivi, kif ukoll kejliet oħrajn tal-QC maż-żmien.

— Il-prestazzjoni taċ-ċelloli H295R għandha tiġi vvalutata billi jintuża platt tal-QC għal kull lott ġdid mill-ATCC jew wara li tintuża ħażna ffriżata qabel ta' ċelloli għall-ewwel darba sakemm ma jkunx sar test tal-profiċjenza tal-laboratorju (paragrafi 32-34) b'dak il-lott ta' ċelloli,

— Platt tal-QC jipprovdi valutazzjoni sħiħa tal-kundizzjonijiet tal-assaġġ (eż., il-vijabbiltà taċ-ċelloli, il-kontrolli tas-solvent, il-kontrolli negattivi u pożittivi, kif ukoll il-varjabbiltà intra u interassaġġi) meta jiġu ttestjati s-sustanzi kimiċi u għandu jkun parti minn kull test.

37. It-test tal-QC isir fi platt b'24 toqba u jsegwi l-istess proċeduri ta' inkubazzjoni, dożaġġ, vijabbiltà/ċitotossiċità taċ-ċelloli, estrazzjoni tal-ormon u analiżi tal-ormon deskritti fil-paragrafi 38 sa 46 għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi. Il-platt tal-QC fih vojta, kontrolli tas-solvent, u żewġ konċentrazzjonijiet ta' induttur magħruf (forskolin, 1, 10 μM) u inibitur (prokloraz, 0,1, 1 μM) tas-sinteżi ta' E2 u T. Barra minn hekk, MeOH jintuża f'toqob magħżulin bħala kontroll pożittiv għall-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossiċità. Deskrizzjoni dettajlata tat-tifsila tal-platt hija pprovdta fit-Tabella 4. Il-kriterji li għandhom jiġu ssodisfati fil-platt tal-QC huma elenkati fit-Tabella 5. Il-produzzjoni minima tal-ormon bażi għal T u E2 għandha tiġi ssodisfata kemm fil-kontroll tas-solvent kif ukoll fit-toqob vojta.

Tabella 4

Tifsira tal-platt tal-kontroll tal-kwalità għall-ittestjar tal-prestazzjoni ta' ċelloli H295R mhux esposti u ċelloli esposti għal inibituri magħrufin (PRO = prokloraz) u stimulaturi (FOR = forskolin) tal-produzzjoni ta' E2 u T. Wara li jintemm l-esperiment ta' esponiment u jitneħħa l-midjum, ser tiżdied soluzzjoni ta' metanol ta' 70 % mat-toqob kollha ta' MeOH biex isservi ta' kontroll pożittiv għaċ-ċitotossiċità (ara l-assaġġ taċ-ċitotossiċità fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Vojta ([a])	Vojta ([a])	Vojta ([a])	Vojta ([a]) (+ MeOH) ([b])	Vojta ([a]) (+ MeOH) ([b])	Vojta ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼**M5**

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

([a]) Ċelloli f'toqob Vojta jirċievu midjum biss (jiġifieri ebda solvent).
([b]) Metanol (MeOH) ser jiżdied **wara** li jintemm l-esponiment u l-midjum jitneħħa minn dawn it-toqob.
([c]) Kontroll tas-solvent tad-DMSO (1 µl/toqba).

Tabella 5

Kriterji tal-prestazzjoni għall-Platt tal-Kontroll tal-Kwalità

	T	E2
Produzzjoni bażi ta' ormon fil-kontroll solvent (SC)	≥ 5 darbiet l-LOQ	≥ 2,5 darbiet l-LOQ
Induzzjoni (10 µM forskolin)	≥ 1,5 darbiet l-SC	≥ 7,5 darbiet l-SC
Inibizzjoni (1µM prokloraz)	≤ 0,5 darbiet l-SC	≤ 0,5 darbiet l-SC

PROĊEDURA TA' ESPONIMENT GĦAL SUSTANZA KIMIKA

38. Iċ-ċelloli preinkubati jitneħħew mill-inkubatur (paragrafu 21) u jiġu kkontrollati taħt mikroskopju biex jiġi żgurat li huma f'kundizzjoni tajba (kemm qabdu, il-morfoloġija) qabel id-dożaġġ.

39. Iċ-ċelloli jitqiegħdu f'kabina tal-bijosikurezza u l-midjum supplimentat jitneħħa u jinbidel ma' midjum supplimentat ġdid (1 ml/toqba). DMSO huwa s-solvent ippreferut għal dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, jekk hemm raġunijiet sabiex jintużaw solventi oħrajn, għandha tiġi deskritta r-raġuni xjentifika. Iċ-ċelloli huma esposti għas-sustanza kimika ta' ttestjar b'żieda ta' 1 µl tas-soluzzjoni tal-ħażna xierqa fid-DMSO (ara l-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4)) għal kull 1 ml midjum supplimentat (volum tat-toqba). Dan jirriżulta f'konċentrazzjoni finali ta' 0,1 % DMSO fit-toqob. Biex jiġi żgurat taħlit adegwat, ġeneralment huwa ppreferut li s-soluzzjoni tal-ħażna xierqa tas-sustanza kimika tat-test fid-DMSO titħallat ma' midjum supplimentat biex tinkiseb il-konċentrazzjoni finali mixtieqa għal kull doża, u t-taħlita tiżdied ma' kull toqba eżatt wara t-tneħħija tal-midjum il-qadim. Jekk tintuża din l-għażla, il-konċentrazzjoni tad-DMSO (0,1 %) għandha tibqa' konsistenti bejn it-toqob kollha. It-toqob li fihom l-ikbar żewġ konċentrazzjonijiet jiġu vvalutati viżwalment għal formazzjoni ta' preċipitati jew dardir bħala indikazzjoni ta' solubilità inkompluta tas-sustanza kimika tat-test billi jintuża sterjomikroskopju. Jekk jiġu osservati dawn il-kundizzjonijiet (dardir, formazzjoni ta' preċipitati), it-toqob li fihom l-inqas konċentrazzjonijiet li jmiss jiġu eżaminati wkoll (u l-bqija) u l-konċentrazzjonijiet li ma ddaħħlux kompletament fis-soluzzjoni għandhom jiġu eskluż minn evalwazzjoni u analiżi ulterjuri. Il-platt jittieħed lura fl-inkubatur f'37 °C f'5 % CO_2 f'atmosfera tal-arja għal 48 siegħa. It-tifsila tal-platt tas-sustanza kimika tat-test tintwera fit-Tabella 6. Il-ħażniet 1 -7 juru tfassil b'dożijiet li jiżdiedu tas-sustanza kimika tat-test.

▼M5

Tabella 6

Skematika tad-dożaġġ għall-esponiment ta' ċelloli H295R biex jiġu ttestjati sustanzi kimiċi fi platt b'24 toqba

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Ħażna 4	Ħażna 4	Ħażna 4
B	Ħażna 1	Ħażna 1	Ħażna 1	Ħażna 5	Ħażna 5	Ħażna 5
C	Ħażna 2	Ħażna 2	Ħażna 2	Ħażna 6	Ħażna 6	Ħażna 6
D	Ħażna 3	Ħażna 3	Ħażna 3	Ħażna 7	Ħażna 7	Ħażna 7

40. Wara 48 siegħa, il-platti ta' esponiment jitneħħew mill-inkubatur u kull toqba tiġi kkontrollata taħt il-mikroskopju għall-kundizzjoni taċ-ċelloli (kemm qabdu, il-morfoloġija, il-grad ta' konfluwenza) u sinjali ta' ċitotossiċità. Il-midjum minn kull toqba jinqasam f'żewġ ammonti ndaqs (madwar 490 µl kull wieħed) u jiġi ttrasferit f'żewġ kunjetti separati mmarkati kif xieraq (jiġifieri alikwota waħda biex jiġi pprovdut kampjun ta' riżerva għal kull toqba). Biex jiġi evitat milli jinxfu ċ-ċelloli, il-midjum jitneħħa ringiela, ringiela jew kolonna, kolonna u jiġi sostitwit ma' midjum għall-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossiċità taċ-ċelloli. Jekk il-vijabbiltà/ċitotossiċità taċ-ċelloli ma titkejjilx mill-ewwel, jiżdied 200 µl PBS b'Ca^{2+} u Mg^{2+} f'kull toqba. Il-midjums jiġu ffriżati f'– 80 °C sa ma jsir iktar ipproċessar biex jiġu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni (ara l-paragrafi 44-46). Filwaqt li T u E2 f'midjum miżmum f'– 80 °C huma ġeneralment stabbli għal tal-inqas 3 xhur, l-istabbiltà tal-ormoni matul il-ħżin għandha tiġi dokumentata fi ħdan kull laboratorju.

41. Eżatt wara li jitneħħa l-midjum, jiġu determinati l-vijabblità/ċitotossiċità taċ-ċelloli għal kull platt ta' esponiment.

Determinazzjoni tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

42. Assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossiċità taċ-ċelloli tal-għażla tista' tintuża biex jiġi determinat l-impatt potenzjali tas-sustanza kimika tat-test fuq il-vijabbiltà taċ-ċelloli. L-assaġġ għandu jkun jista' jipprovdi kejl veru tal-perċentwal ta' ċelloli vijabbil preżenti f'toqba, jew għandu jintwera li dan huwa direttament paragunabbli (funzjoni lineari ta') mal-Assaġġ Live/Dead® (ara l-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4)). Assaġġ alternattiv li ntwera li jaħdem daqstantieħor huwa t-test MTT [3-(4,5-dimetiltjażol-2-yl)-2,5-difenil tetrażolju bromur] (18). Il-valutazzjoni tal-vijabbiltà taċ-ċelloli bl-użu tal-metodi ta' hawn fuq hija kejl relattiv li mhux bilfors juri relazzjonijiet lineari man-numru assolut ta' ċelloli f'toqba. Għalhekk, l-analist għandu jagħmel valutazzjoni viżwali parallela soġġettiva ta' kull toqba, u għandhom jittieħdu ritratti diġitali tal-SCs u tal-ikbar żewġ konċentrazzjonijiet mhux tossiċi li mbagħad jiġu arkivjati biex tkun tista' ssir valutazzjoni iktar tard tad-densità vera taċ-ċelloli jekk ikun hemm bżonn. Jekk spezzjoni viżwali jew kif muri mill-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossiċità jidher li hemm żieda fin-numru ta' ċelloli, iż-żieda apparenti trid tiġi verifikata. Jekk tiġi verifikata żieda fin-numri ta' ċelloli, din għandha tiġi ddikjarata fir-rapport tat-test. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli ser tingħata b'mod relattiv għar-rispons medju fl-SCs, li jitqies li huwa ċelloli vijabbli 100 %, u hija kkalkolata kif xieraq għall-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossiċità taċ-ċeloli li jintuża. Għall-assaġġ tal-MTT, tista' tintuża l-formula li ġejja:

▼M5

% ċelloli vijabbli = (rispons fit-toqba – rispons medju f'toqob mogħtija MeOH [= 100 % mejtin]) ÷ (rispons medju f'toqob SC – rispons medju f'toqob mogħtija MeOH [= 100 % mejtin])

43. Toqob b'varjabbiltà inqas minn 80 %, relatati mal-vijabbiltà medja fl-SCs (= 100 % vijabbiltà), ma għandhomx ikunu inklużi fl-analiżi tad-dejta finali. L-inibizzjoni tal-isterojdoġenesi li sseħħ fil-preżenza ta' kważi 20 % ċitotossiċità għandha tiġi evalwata bir-reqqa biex jiġi żgurat li ċ-ċitotossiċità mhijiex il-kawża għall-inibizzjoni.

Analiżi tal-Ormoni

44. Kull laboratorju jista' juża sistema ta' kejl tal-ormoni tal-għażla tiegħu għall-analiżi ta' T u E2. Jistgħu jintużaw alikwoti ta' riżerva ta' midjum minn kull grupp tal-kura biex jitħejjew dilwizzjonijiet ħalli l-konċentrazzjoni tiġi fi ħdan il-parti lineari tal-kurva standard. Kif osservat fil-paragrafu 29, kull laboratorju għandu juri l-konformità tas-sistema ta' kejl tal-ormoni tiegħu (eż., ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) mal-kriterji tal-QC billi janalizza midjum supplimentat miżjud b'kontroll tal-ormon intern qabel ma jwettaq testijiet tal-QC jew ittestjar ta' sustanzi kimiċi. Sabiex jiġi żgurat li l-komponenti tas-sistema tat-test ma jxekklux il-kejl tal-ormoni, l-ormoni jista' jkollhom bżonn jiġu estrattati mill-midjums qabel ma jitkejlu (ara l-paragrafu 30 għall-kundizzjonijiet li fihom ikun hemm jew ma jkunx hemm bżonn estrazzjoni). Huwa rakkomandat li ssir estrazzjoni wara l-proċeduri fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4).

45. Jekk qed tintuża kitt kummerċjali tat-testijiet biex titkejjel il-produzzjoni tal-ormoni, l-analiżi tal-ormoni għandha ssir kif speċifikat fil-manwali pprovduti mill-manifattur tal-kitt tat-testijiet. Ħafna mill-manifatturi għandhom proċedura unika li biha jsiru l-analiżijiet tal-ormoni. Id-dilwizzjonijiet tal-kampjuni jridu jiġu aġġustati b'tali mod li l-konċentrazzjonijiet mistennija tal-ormoni għall-kontrolli tas-solvent jaqgħu fi ħdan iċ-ċentru tal-medda lineari tal-kurva standard tal-assaġġ individwali (Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4)). Valuri li jaqgħu barra s-sehem lineari tal-kurva standard għandhom jiġu rrifjutati.

46. Il-konċentrazzjonijiet tal-ormoni finali huma kkalkolati kif ġej:

Eżempju:

Estratti:	450 µl midjum
Rikostitwiti f':	250 µl bafer tal-assaġġ
Dilwizzjoni fl-Assaġġ:	1:10 (biex il-kampjuni jiġi fi ħdan il-medda lineari tal-kurva standard)
Konċentrazzjoni ta' Ormoni fl-Assaġġ:	150 pg/ml (diġà aġġustata għall-konċentrazzjoni għal kull ml tal-kampjun fl-assaġġ)
Irkupru:	89 %
Konċentrazzjoni tal-ormoni finali =	(Konċentrazzjoni tal-ormoni (għal kull ml) ÷ irkupru) (fattur ta' dilwizzjoni)
Konċentrazzjoni tal-ormoni finali =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

47. Għandhom isiru tal-inqas żewġ testijiet indipendenti tal-assaġġ. Sakemm informazzjoni preċedenti dwar il-limitu ta' solubilità jew iċ-ċitotossiċità ma tipprovdix bażi għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test, huwa rakkomandat li l-konċentrazzjonijiet tat-test għall-ewwel test ikollhom intervalli ta' $\log_{10}$ b'10^{-3} M li tkun il-konċentrazzjoni massima. Jekk is-sustanza kimika hija solubbli, u mhux ċitotossika fl-ebda mill-konċentrazzjonijiet ittestjati, u l-ewwel test ikun negattiv għall-konċentrazzjonijiet kollha, mela dan irid jiġi kkonfermat f'test wieħed jew iktar billi jintużaw l-istess kundizzjonijiet bħal dawk fl-ewwel test li sar (Tabella 7). Jekk ir-riżultati tal-ewwel test huma *ekwivoċi* (jiġifieri l-bidla ta' drabi hija statistikament sinifikanti mill-SC f'konċentrazzjoni waħda biss) jew pożittivi (jiġifieri l-bidla ta' drabi f'żewġ konċentrazzjonijiet maġenb jew iktar hija statistikament sinifikanti), it-test għandu jiġi ripetut kif indikat fit-Tabella 7 billi jiġu rfinati l-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin. Il-konċentrazzjonijiet tat-test fit-tieni u t-tielet test (jekk applikabbli) għandhom jiġu aġġustati fuq il-bażi tar-riżultati tal-konċentrazzjonijiet parentesi li ġew ittestjati inizjalment li kkaġunaw effeett billi ntuża intervall ta' konċentrazzjoni ta' 1/2-log (eż., jekk it-test oriġinali ta' 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM irriżulta f'induzzjonijiet b'1 u 10 μM, il-konċentrazzjonijiet ittestjati fit-tieni test għandhom ikunu 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), sakemm ma jkunx hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjonijiet inqas biex jinkiesb LOEC. Fl-aħħar każ, tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet taħt l-inqas konċentrazzjoni ttestjata fl-ewwel test għandhom jintużaw fit-tieni test billi tintuża skala ta' 1/2-log. Jekk it-tieni test ma jikkonfermax l-ewwel test (jiġifieri l-importanza statistika ma sseħħx fil-konċentrazzjoni li qabel ittestjat pożittiva, inkrement tal-konċentrazzjoni ta' ± 1), għandu jsir it-tielet esperiment billi jintużaw il-kundizzjonijiet oriġinali ta' ttestjar. Riżultati ekwivoċi fl-ewwel test jitqiesu negattivi jekk l-effett osservat ma jkunx jista' jiġi kkonfermat fl-ebda wieħed miż-żewġ testijiet ta' wara. Riżultati ekwivoċi jitiqesu risponsi (effett) pożittivi meta r-rispons ikun jista' jiġi kkonfermat f'tal-inqast testieħor fi ħdan inkrement tal-konċentrazzjoni ta' ± 1 (ara t-taqsima 55 għall-Proċedura ta' Interpretazzjoni tad-Dejta).

Tabella 7

Matriċi tad-deċiżjonijiet għal xenarji ta' eżitu possibbli

Test 1	Test 2		Test 3		Deċiżjoni	
Xenarju	Deċiżjoni	Xenarju	Deċiżjoni	Xenarju	Pożittiva	Negattiva
Negattiv	Konferma ([a])	Negattiv	Waqfa			X
Negattiv	Konferma ([a])	Pożittiv	Irfinar ([b])	Negattiv		X
Ekwivoku ([c])	Irfinar ([b])	Negattiv	Konferma ([a])	Negattiv		X
Ekwivoku ([c])	Irfinar ([b])	Negattiv	Konferma ([a])	Pożittiv	X	
Ekwivoku ([c])	Irfinar ([b])	Pożittiv			X	
Pożittiv	Irfinar ([b])	Negattiv	Konferma ([a])	Pożittiv	X	

▼M5

Test 1	Test 2		Test 3		Deċiżjoni	
Xenarju	Deċiżjoni	Xenarju	Deċiżjoni	Xenarju	Pożittiva	Negattiva
Negattiv	Konferma ([a])	Pożittiv	Irfinar ([b])	Pożittiv	X	
Pożittiv	Irfinar ([b])	Pożittiv	Waqfa		X	

([a]) Ikkonferma test preċedenti bl-użu tal-istess tifsila tal-esperiment.
([b]) Erġa' ttestja l-assaġġ b'intervall ta' konċentrazzjoni ta' 1/2-log (parentesi tal-konċentrazzjoni li ttestjat notevolment differenti fl-esperiment preċedenti).
([c]) Bidla ta' drabi f'konċentrazzjoni waħda hija b'mod sinifikatament differenti fil-livell statistiku mill-SC

Kontroll tal-Kwalità tal-Platt tat-Test

48. Minbarra l-ilħuq tal-kriterji għall-platt tal-QC, għandhom jiġu ssodisfati kriterji oħrajn tal-kwalità li jappartjenu għal varjazzjoni aċċettabbli bejn toqob replikati, esperimenti replikati, linearità u sensittività tas-sistemi ta' kejl tal-ormoni, varjabbiltà bejn kejliet replikati tal-ormini tal-istess kampjun, u rkupru tal-perċentwal ta' żidiet mal-ormoni wara estrazzjoni tal-midjum (jekk applikabbli; ara l-Paragrafu 30 rigward ir-rekwiżiti ta' estrazzjoni) u dawn huma pprovduti fit-Tabella 8. Id-dejta għandha tkun taqa' fi ħdan il-meded aċċettabbli definiti għal kull parametri li għandu jitqies għal evalwazzjoni ulterjuri. Jekk dawn il-kriterji ma jkunux issodisfati, l-ispreadsheet għandha tinnota li l-kriterji tal-QC ma ġewx issodisfati għall-kampjun inkwistjoni, u li l-kampjun għandu jerġa' jerġa' jiġi analizzat jew jitneħħa mis-sett tad-dejta.

Tabella 8

Meded u/jew varjazzjoni aċċettabbli (%) għall-parametri tal-platt tat-test tal-assaġġ ta' H295R

(LOQ: Limitu ta' Kwantifikazzjoni tas-sistema ta' mmaniġġjar tal-ormoni. CV: Koeffiċjent tal-varjazzjoni; SC: Kontroll tas-Solvent; DPM: Diżintegrazzjonijiet fil-minuta)

	Tqabbil Bejn	T	E2
Produzzjoni tal-ormoni bażi f'SCs	Darbiet ikbar mil-LOQ	≥ 5 darbiet iktar	≥ 2,5 darbiet iktar
Esperimenti tal-Esponiment — Fi ħdan is-CV tal-Platt għal SCs (Toqob Replikati)	Konċentrazzjonijiet Assoluti	≤ 30 %	≤ 30 %
Esperimenti tal-Esponiment — Bejn CV tal-Platt għal SCs (Esperimenti Replikati)	Bidla fi Drabi Ikbar	≤ 30 %	≤ 30 %
Sistema ta' Kejl tal-Ormoni — Sensittività	Tnaqqis fi drabi identifikabbli relatat mal-SC	≥ 5 darbiet inqas	≥ 2,5 darbiet inqas
Sistema ta' Kejl tal-Ormoni — CV tal-Kejl Replikat għal SCs ([a])	Konċentrazzjonijiet Assoluti	≤ 25 %	≤ 25 %
Estrazzjoni tal-Midjum — Irkupru tal-Istandard Intern 3H (Jekk Applikabbli)	DPM	≥ 65 % Nominali	

([a]) B'referenza għall-kejliet replikati tal-istess kampjun

▼M5

ANALIŻI U RAPPORTAR TAD-DEJTA

Analiżi tad-Dejta

49. Biex jiġu evalwati ż-żieda/it-tnaqqis relatati fi produzzjoni tal-ormoni kumikament alterata, ir-riżultati għandhom jiġu normalizzati għall-valur medju tal-SC ta' kull platt tat-test, u r-riżultati espressi bħala bidliet relatati mal-SC f'kull platt tat-test. Id-dejta kollha għandha tiġi espressa bħala devjazzjoni standard (SD) medja ta' ± 1.

50. Dejta dwar l-ormoni mit-toqob fejn iċ-ċitotossiċità kienet inqas minn 20 % biss għandha tkun inkluża fl-analiżi tad-dejta. Il-bidliet relatati għandhom jiġu kkalkolati kif ġej:

Bidla Relattiva = (Konċentrazzjoni ta' ormoni f'kull toqba) ÷ (Konċentrazzjoni medja tal-ormoni fit-toqob kollha ta' kontroll tas-solvent).

51. Jekk permezz ta' spezzjoni viżwali tat-toqba jew kif muri mill-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossiċità deskritti fil-paragrafu 42 jidher li hemm żieda fin-numru ta' ċelloli, iż-żieda apparenti trid tiġi verifikata. Jekk tiġi verifikata żieda fin-numri taċ-ċelloli, din għandha tiġi ddikjarata fir-rapport tat-test.

52. Qabel ma jsiru analiżijiet statistiċi, għandhom jiġu evalwati s-suppożizzjonijiet tan-normalità u l-omoġenità tal-varjanza. In-normalità għandha tiġi evalwata billi jintużaw plots standard tal-probabilità jew metodu statistiku xieraq ieħor (eż., test ta' Shapiro-Wilk). Jekk normalment ma ssirx distribuzzjoni tad-dejta (bidliet fi drabi), għandu jsir tentattiv ta' trasformazzjoni tad-dejta biex tkun approssimata distribuzzjoni normali. Jekk normalment issir distribuzzjoni jew tiġi approssimata distribuzzjoni normali tad-dejta, id-differenzi bejn il-gruppi ta' konċentrazzjoni tas-sustanza kimika u l-SCs għandhom jiġu analizzati billi jintuża test parametriku (eż., it-Test ta' Dunnett) bil-*konċentrazzjoni* li hija l-varjabbli indipendenti, u r-*rispons* (bidla fi drabi) il-varjabbli dipendenti. Jekk normalment id-dejta ma tiġix distribwita, għandu jintuża test xieraq mhux parametriku (eż., it-test ta' Kruskal Wallis, it-test Steel's Many-one rank). Id-differenzi jitqiesu sinifikanti f'$p \leq 0,05$. L-evalwazzjonijiet statistiċi jsiru fuq il-bażi tal-valuri medji għal kull toqba li jirrappreżentaw punti ta' dejta replikati indipendenti. Huwa antiċipat li minħabba l-intervall kbir tad-dożi fl-ewwel test (skala $\log_{10}$) f'ħafna każijiet mhuwiex ser ikun possibbli li jiġu deskritti relazzjonijiet ċari bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons fejn l-ikbar żewġ dożi ser ikunu fis-sehem lineari tal-kurva sigmojde. Għaldaqstant, għall-ewwel test jew kwalunkwe sett ta' dejta ieħor fejn isseħħ din il-kundizzjoni (eż., fejn ma tkun tista' tiġi stmata ebda effikaċja massima), ser jiġu applikati statistiki varjabbli fissi tat-tip I kif deskritti iktar 'il fuq.

53. Jekk ikun hemm iktar minn żewġ punti ta' dejta fis-sehem lineari tal-kurva u meta jkunu jistgħu jiġu kkalkolati l-effikaċji massimi — kif inhu antiċipat għal uħud mit-tieni testijiet li jsiru billi jintuża intervall semi-log ta' konċentrazzjonijiet ta' esponiment — għandu jintuża mudell ta' rigressjoni probit, logit jew ieħor xieraq biex jiġu kkalkolati l-konċentrazzjonijiet effettivi (eż., EC50 u EC20).

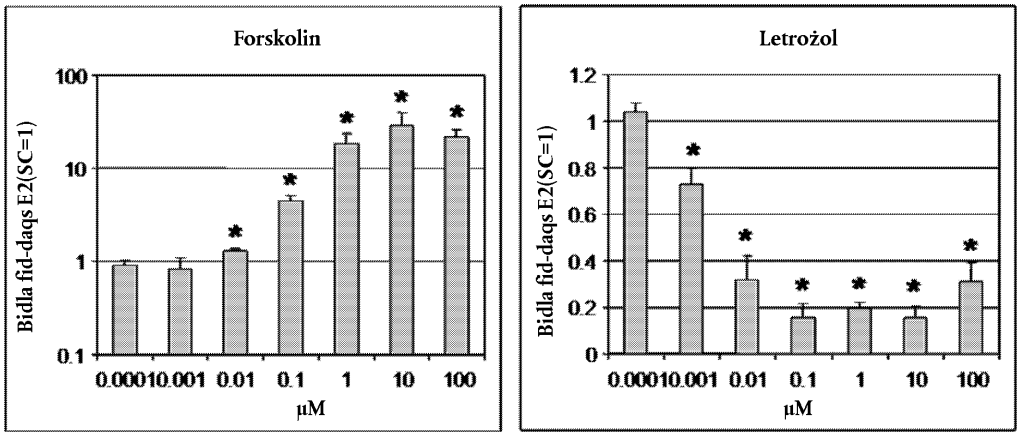
54. Għandhom jiġu pprovduti riżultati kemm f'format grafiku (graffs bil-kolonni li jirrappreżentaw l-SD medja +/- 1) u f'tabella (LOEC/NOEC, direzzjoni tal-effett, u l-qawwa tar-rispons massimu li hija parti mis-sehem doża-rispons tad-dejta) (ara l-Figura 3 għal eżempju). Valutazzjoni tad-dejta titqies valida biss jekk tkun ġiet ibbażata fuq tal-inqas żewġ testijiet li jkunu saru b'mod indipendenti. Esperiment jew test jitqies importanti jekk ikun sar f'data differenti billi jintuża sett ġdid ta' soluzzjonijiet u kontrolli. Il-medda ta' konċentrazzjoni użata fit-testijiet 2 u 3 (jekk ikun hemm bżonnhom) tista' titfassal fuq il-bażi tar-riżultati tat-test 1 biex tiġi definita aħjar il-medda doża-rispons li fiha l-LOEC (ara l-paragrafu 47).

▼M5

Figura 3

Eżempju tal-preżentazzjoni u l-evalwazzjoni tad-dejta miksuba matul it-twettiq tal-Assaġġ ta' H295R f'format grafiku u tabulari.

(L-asteriski jindikaw differenzi statistikament sinifikanti mill-kontroll tas-solvent ($p < 0,05$). (LOEC: L-inqas konċentrazzjoni effettiva osservata; Bidla Mass: Saħħa massima tar-rispons osservat fi kwalunkwe konċentrazzjoni relatata mar-rispons medju tal-SC (= 1))



Sustanza Kimika	LOEC	Bidla Mass
Forskolin	0,01	0,15-il darba
Letrożol	0,001	29 darba

Proċedura ta' Interpretazzjoni tad-Dejta

55. Sustanza kimika tat-test tiġi ġġudikata pożittiva jekk l-induzzjoni bi drabi tkun statistikament differenti ($p \leq 0,05$) mill-kontroll tas-solvent f'żewġ konċentrazzjonijiet maġenb xulxin f'tal-inqas żewġ testijiet indipendenti (Tabella 7). Sustanza kimika tat-test tiġi ġġudikata negattiva wara żewġ testijiet negattivi indipendenti, jew fi tliet testijiet, li jinvolvu żewġ testijiet negattivi u test ekwivoku jew pożittiv. Jekk id-dejta ġġenerata fi tliet esperimenti indipendenti ma tissodisfax il-kriterji ta' deċiżjoni elenkati fit-Tabella 7, ir-riżultati tal-esperiment ma jkunux interpretabbli. Ir-riżultati f'konċentrazzjonijiet li jaqbżu l-limitu tas-solubilità jew f'konċentrazzjonijiet ċitotossiċi ma għandhomx ikunu inklużi fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

Rapport tat-Test

56. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Faċilità ta' ttestjar

— Isem il-faċilità u l-post,

— Id-direttur tal-istudju u persunal ieħor u r-responsabilitajiet ta' studju tiegħu,

— Id-dati li fihom beda u ntemm l-istudju.

▼**M5**

Sustanza kimika tat-test, reaġenti u kontrolli

— L-identità (isem/Nru tas-CAS kif xieraq), is-sors, in-numru tal-lott, il-purità, il-fornitur, u l-karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, ir-reaġenti u l-kontrolli,

— L-għamla fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tas-sustanza kimika tat-test,

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-metodu tal-frekwenza tat-tħejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test, ir-reaġenti u l-kontrolli,

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test.

Ċelloli

— Is-sors u t-tip ta' ċelloli,

— In-numru ta' mogħdijiet taċ-ċelloli (identifikatur tal-mogħdijiet taċ-ċelloli) taċ-ċelloli użati fit-test,

— Deskrizzjoni tal-proċeduri għall-manutenzjoni tal-kolturi taċ-ċelloli.

Rekwiżiti ta' qabel l-ittestjar (jekk applikabbli)

— Deskrizzjoni u riżultati tat-test ta' interferenza tal-assaġġ tal-ormoni mas-sustanza kimiċi,

— Deskrizzjoni u riżultati tal-kejliet tal-effiċjenza tal-estrazzjoni tal-ormoni,

— Il-kurvi standard u ta' kalibrazzjoni għall-assaġġi analitiċi li għandom ikunu inklużi,

— Il-limiti ta' identifikazzjoni għall-assaġġi analitiċi magħżulin,

Kundizzjonijiet tat-test

— Il-kompożizzjoni tal-midjums,

— Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test,

— Id-densità taċ-ċelloli (konċentrazzjonijiet stmati jew imkejlin taċ-ċelloli wara 24 u 48 siegħa),

— Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test (limitu tas-solubilità, jekk determinat),

— Il-ħin u l-kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni.

Riżultati tat-test

— Dejta mhux ipproċessata għal kull toqba għal kontrolli u sustanzi kimiċi tat-test-kull kejl replikat fil-forma ta' dejta oriġinali pprovduta mill-istrument użat biex titkejjel il-produzzjoni tal-ormoni (eż., OD, unitajiet tal-fluworexxenza, DPM, eċċ.),

— Il-validazzjoni tan-normalità jew l-ispjegazzjoni tat-trasformazzjoni tad-dejta;

— Ir-risponsi medji +/- 1 SD għal kull toqba mkejla,

— Dejta dwar iċ-ċitotossiċità (konċentrazzjonijiet tat-test li kkaġunaw ċitotossiċità),

— Konferma li ġew issodisfati r-rekwiżiti tal-QC,

▼M5

— Il-bidla relattiva mqabla mal-kontroll tas-solventi kkoreġut għaċ-ċitotossiċità,

— Graff bil-kolonni li juri relattiv (bidla ta' drabi) f'kul konċentrazzjoni, SD u sinifikanza statistika kif spjegat fil-paragrafu 49-54.

Interpretazzjoni tad-dejta

— Applikazzjoni tal-proċedura ta' interpretazzjoni tad-dejta għar-riżultati u diskussjoni tas-sejbiet,

Diskussjoni

— Hemm xi indikazzjoni mill-istudju dwar il-possibilità li d-dejta dwar T/E2 tista' tkun influwenzata minn effetti indiretti fuq il-mogħdijiet glukokortikojdi u mineralikortikojdi?

Konklużjonijiet

TAGĦRIF

(1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, fl-Appendiċi 2 għall-Kapitolu B.54 ta' dan l-Anness.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114-124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23 — 30.

(4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/-MONO(2010)31, Pariġi. Disponibbli fuq [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Disponibbli fuq: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78-89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44-54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265-272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137-1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488-5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578-584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777-2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137-1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731-737.

(16) Il-Kapitolu B.55 ta' dan l-Anness: Bijoassaġġ Hershberger f'Firien: Assaġġ ta' Tgħarbil ta' Terminu Qasir għal Proprjetajiet (Anti)Androġeniċi.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222-231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55-63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

▼M5

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET:

Konfluwenza tirreferi għall-kopertura jew il-proliferazzjoni li ċ-ċelloli jitħallew jagħmlu tul jew fi ħdan il-midjum tal-koltura.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

CV tirreferi għall-koeffiċjent tal-varjazzjoni, u hija definita bħala l-proporzjon tad-devjazzjoni standard ta' distribuzzjoni għall-medja aritmetiku tagħha.

CYP tirreferi għall-monoossiġenasi taċ-ċitokroma P450, familja ta' ġeni u l-enżimi prodotti minnhom li huma involuti fl-iskattar ta' firxa wiesgħa ta' reazzjonijiet bijokimiċi inklużi s-sinteżi u l-metaboliżmu tal-ormoni sterojdi.

DPM hija diżintegrazzjoni fil-minuta. Hija n-numru ta' atomi fi kwantità partikolari ta' materjal radjuattiv li huwa identifikat li ntilef f'minuta.

E2 hija 17β-estradjol, l-iktar estroġen importanti fis-sistemi tal-mammiferi.

Ċelloli H295R huma ċelloli adrenokarċinoma tal-bniedem li għandhom il-karatteristiċi fiżjoloġiċi ta' ċelloli adrenali tal-fetu tal-bniedem mhux differenzjati b'mod żonali u li jesprimu l-enżimi kollha tal-mogħdija tal-isterojdoġenesi. Huma disponibbli mill-ATCC.

Midjum tal-iffriżar jintuża biex jiġu ffriżati u jinħażnu ċelloli ffriżati. Jikkonsisti f'midjum tal-ħżin flimkien ma' BD NuSerum u dimetil sulfossidu.

Medda Lineari hija l-medda fi ħdan il-kurva standard għal sistema ta' kejl tal-ormoni li fiha r-riżultati jkunu proporzjonati għall-konċentrazzjoni tal-analit preżenti fil-kampjun.

LOQ tfisser *"Limitu ta' Kwantifikazzjoni"*, u hija l-inqas kwantità ta' sustanza kimika li tista' tiġi distinta min-nuqqas ta' dik is-sustanza kimika (valur vojt) fi ħdan limitu ta' kunfidenza ddikjarat. Għall-fini ta' dan il-metodu, l-LOQ tipikament hija definita mill-manifattur tas-sistemi tat-test jekk ma jkunx speċifikat b'mod differenti.

LOEC l-Inqas Konċentrazzjoni b'Effett Osservata, l-inqas livell ta' konċentrazzjoni li fih ir-rispons tal-assaġġ ikun statistikament differenti minn dak tal-kontroll tas-solvent.

NOEC hija l-Konċentrazzjoni bl-Ebda Effett Osservat, li hija l-ogħla konċentrazzjoni ttestjata jekk l-assaġġ ma jipprovdix rispons pożittiv.

Mogħdija hija n-numru ta' drabi li ċ-ċelloli jinqasmu wara t-tnedija ta' koltura minn ħażna. Il-mogħdija inizjali li nbdiet mill-ħażna ffriżata hija assenjata n-numru wieħed (1). Iċ-ċelloli li nqasmu darba jiġu mmarkati mogħdija 2, eċċ.

PBS hija s-salmastru bafer fosfat ta' Dulbecco.

Kontroll tal-Kwalità, imqassra QC, tirreferi għall-kejliet meħtieġa biex tiġi żgurata dejta valida.

Platt ta' kontroll tal-kwalità huwa platt b'24 toqba li fih żewġ konċentrazzjonijiet tal-kontrolli pożittivi u negattivi biex tiġi ssorveljata l-prestazzjoni ta' lott ġdid ta' ċelloli jew biex jiġu pprovduti l-kontrolli pożittivi għall-assaġġ meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi.

Test huwa esperiment indipendenti kkaratterizzat minn sett ġdid ta' soluzzjonijiet u kontrolli.

▼**M5**

Midjum tal-ħżin huwa l-bażi għall-preparazzjoni ta' reaġenti oħrajn. Jikkonsisti f'taħlita 1:1 ta' Dulbecco's Modified Eagle's Medium u t-taħlita tan-Nutrijenti F-12 ta' Ham (DMEM/F12) f'bafer ta' 15 mM HEPES bla fenol aħmar jew bikarbonat tas-sodju. Il-bikarbonat tas-sodju jiżdied bħala l-bafer, ara l-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4).

Midjum supplimentat jikkonsisti f'midjum tal-ħżin flimkien ma' BD Nu-Serum u taħlita primjum ITS+, ara l-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4).

Sterojdoġenesi hija l-mogħdija sintetika li twassal mill-kolesterol għad-diversi ormoni sterojdi. Bosta intermedjati fil-mogħdija tas-sinteżi tal-isterojdi bħal proġestron u testosteron huma ormoni importanti meta waħedhom iżda jservu wkoll ta' prekursuri għal ormoni lil hinn fil-mogħdija sintetika.

T tfisser testosteron, wieħed mill-iktar żewġ androġeni importanti fis-sistemi mammiferi.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi ntuża dan il-metodu ta' ttestjar.

Platt tat-test huwa l-platt li fih iċ-ċelloli H295R jiġu esposti għal sustanzi kimiċi tat-test. Il-platti tat-test fihom il-kontroll tas-solvent u s-sustanza kimika tat-test f'seba' livelli ta' konċentrazzjoni fi triplikat.

Tripsina 1X hija soluzzjoni dilwita tat-tripsina tal-enżima, proteasi tas-serina pankreatika, użata biex tillaxka ċ-ċelloli minn platt ta' koltivazzjoni taċ-ċelloli, ara l-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4).

▼M5

B.58. **ASSAĠĠI TAL-MUTAZZJONI TAL-ĠENI SOMATIĊI U TAĊ-ĊELLOLI TAL-ĠERMI TA' RODITURI TRANSĠENIĊI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tal-OECD dwar it-Testijiet (TG) Nru 488 (2013). Il-metodi ta' ttestjar tal-UE huma disponibbi għal firxa wiesgħa ta' assaġġi tal-mutazzjoni *in vitro* li kapaċi jidentifikaw mutazzjonijiet fil-kromożomi u/jew fil-ġeni. Hemm metodi ta' ttestjar għal punti aħħarin *in vivo* (jiġifieri aberrazzjonijiet tal-kromożomi u sinteżi mhux skedata tad-DNA); madankollu, dawn ma jkejlux il-mutazzjonijiet tal-ġeni. Assaġġi tal-mutazzjoni ta' Rodituri Transġeniċi (TGR) jissodisfaw il-bżonn ta' testijiet *in vivo* prattiċi u disponibbli b'mod komuni għal mutazzjonijiet ta' ġeni.

2. L-assaġġi tal-mutazzjoni ta' TGR ġew analizzati b'mod estensiv (24)(33). Jużaw firien u ġrieden transġeniċi li fihom bosta kopji ta' vetturi plażmidi integrati b'mod kromożomali jew phage shuttle. It-transġeni fihom ġeni rapportaturi għall-identifikazzjoni ta' bosta tipi ta' mutazzjonijiet ikkaġunati *in vivo* mis-sustanzi kimiċi tat-test.

3. Mutazzjonijiet li jfeġġu f'roditur jingħataw punteġġ billi jiġi rkuprat it-transġene u jiġi analizzat il-fenotip tal-ġene rapportatur f'ospitant batterjali defiċjenti għall-ġene rapportatur. L-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR ikejlu mutazzjonijiet ikkaġunati f'ġeni ġenetikament newtrali rkuprati minn prattikament kwalunkwe tessut tar-roditur. Għalhekk, dawn l-assaġġi jgħelbu ħafna mil-limitazzjonijiet eżistenti assoċjati mal-istudju ta' mutazzjoni tal-ġeni *in vivo* f'ġeni endoġeni (eż. tessuti limitati xierqa għal analiżi, għażla negattiva/pożittiva kontra mutazzjonijiet).

4. Il-piż tal-evidenza jissuġġerixxi li t-transġeni jwieġbu għall-mutaġeni b'mod simili għal ġeni endoġeni, speċjalment fir-rigward tal-identifikazzjoni ta' sostituzzjonijiet ta' pari bażi, mutazzjonijiet fil-bidla tal-qafas, u tħassiriet u tidħiliet żgħar(24).

5. Il-Workshops Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossiċità (IWGT) approvaw l-inklużjoni tal-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR għall-identifikazzjoni *in vivo* ta' mutazzjonijiet fil-ġeni, u rrakkomandaw protokoll għall-implimentazzjoni tagħhom (15)(29). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq dawn ir-rakkomandazzjonijiet. Analiżi ulterjuri li ssostni l-użu ta' dan il-protokoll tista' tinkiseb f'(16).

6. Huwa anċipat li fil-ġejjieni jista' jkun possibbli li assaġġ tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR jingħaqad ma' studju tat-tossiċità tad-doża ripetuta (Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness). Madankollu, hemm bżonn ta' dejta biex jiġi żgurat li s-sensittività tal-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR mhijiex affettwata mill-perjodu iqsar ta' żmien ta' jum bejn tmiem il-perjodu ta' għoti u l-ħin tal-kampjunar, kif użat fl-istudju tat-tossikoloġija b'doża ripetuta, imqabbel mat-3 ijiem użati fl-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR. Hemm bżonn dejta wkoll biex tindika li l-prestazzjoni tal-assaġġ b'doża ripetuta mhijiex affettwata b'mod avvers billi ntużat razza ta' rodituri transġeniċi minflok razez ta' rodituri tradizzjonali. Meta din id-dejta tkun disponibbli, dan il-metodu ta' ttestjar ser jiġi aġġornat.

7. Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi.

▼**M5**

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

8. L-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR li għalihom hemm disponibbli biżżejjed dejta biex issostni l-użu tagħhom f'dan il-metodu ta' ttestjar huma: ġurdien batterjofago *lacZ* (Muta™Mouse); ġurdien plażmidu *lacZ*; ġurdien u far *gpt* delta (*gpt* u Spi^{-} *)*; ġurdien u far *lacI* (Big Blue®), kif isiru f'kundizzjonijiet standard. Barra minn hekk, l-assaġġ ta' għażla pożittiva *cII* jista' jintuża għall-evalwazzjoni ta' mutazzjonijiet fil-mudelli Big Blue® u Muta™Mouse. Normalment, il-mutaġenesi fil-mudelli ta' TGR tiġi vvalutata bħala frekwenza tal-mutanti; madankollu, jekk ikun hemm bżonn, analiżi molekolari tal-mutazzjonijiet tista' tipprovdi iktar informazzjoni (ara l-paragrafu 24).

9. Dawn it-testijiet ta' mutazzjoni tal-ġeni *in vivo* fuq rodituri huma speċjalment rilevanti għall-valutazzjoni tal-periklu mutaġeniku peress li r-risponsi tal-assaġġi huma dipendenti fuq metaboliżmu *in vivo*, farmakokinetika, proċessi ta' tiswija tad-DNA, u sinteżi tat-transleżjoni tad-DNA, għad li dawn jistgħu jvarjaw bejn l-ispeċi, bejn it-tessuti u bejn it-tipi ta' ħsara fid-DNA. Assaġġ *in vivo* għal mutazzjonijiet tal-ġeni huwa utli għal investigazzjoni ulterjuri ta' effett mutaġeniku identifikat minn sistema *in vitro*, u bħala segwitu għar-riżultati tat-testijiet billi jintużaw punti aħħarin *in vivo* oħrajn (24). Minbarra li hija assoċjata b'mod kawżali mal-induzzjoni tal-kanċer, il-mutazzjoni tal-ġeni hija punt aħħari rilevanti għat-tbassir ta' mard mhux kanċeruż ibbażat fuq mutazzjoni f'tessuti somatiċi (12)(13) kif ukoll mard trasmess permezz tal-linja ġerminali.

10. Jekk hemm evidenza li s-sustanza kimika tat-test, jew metabolita rilevanti, ma hi ser tilħaq ebda tessut ta' interess, ma jkunx xieraq li jsir assaġġ tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Fl-assaġġi deskritti fil-paragrafu 8, il-ġene fil-mira huwa ta' oriġini batterjali jew batterjofaga, u l-mezz ta' rkupru mid-DNA ġenomika tar-rodituri huwa permezz ta' inkorproazzjoni tat-transġene f'vettur batterjofagu λ jew vettur shuttle plażmid. Il-proċedura tinvolvi l-estrazzjoni tad-DNA ġenomiku mit-tessut ta' interess tar-rodituri, l-ipproċessar *in vitro* tad-DNA ġenomiku (jiġifieri l-imballaġġ ta' vetturi λ, jew il-ligazzjoni u l-elettroporazzjoni ta' plażmidi għall-irkupru tal-vettur shuttle), u l-identifikazzjoni sussegwenti ta' mutazzjonijiet f'ospitanti batterjali f'kundizzjonijiet xierqa. L-assaġġi jħaddmu transġeni newtrali li malajr jistgħu jiġu rkuprati minn ħafna mit-tessuti.

12. L-esperiment bażiku tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR jinvolvi kura tar-roditur b'sustanza kimika fuq perjodu ta' żmien. Is-sustanzi kimiċi jistgħu jingħataw permezz ta' kwalunkwe rotta xierqa, inkluża impjantazzjoni (eż. ittestjar ta' apparat mediku). Il-perjodu totali li matulu annimali jingħata d-doża jissejjaħ il-perjodu tal-għoti. L-għoti normalment ikun segwit minn perjodu ta' żmien, qabel is-sagrifiċċju, li matulu s-sustanza kimika ma tingħatax u li matulu l-leżjonijiet tad-DNA mhux imsewwijin jiġu fissati f'mutazzjonijiet stabbli. Fit-tagħrif, dan il-perjodu ssejjaħ b'modi oħrajn bħala l-ħin ta' manifestazzjoni, il-ħin ta' fissazzjoni jew il-ħin ta' espressjoni; tmiem dan il-perjodu huwa ħin il-kampjunar (15)(29). Wara li l-annimal jiġi sagrifikat, id-DNA ġenomiku jiġi iżolat mit-tessut(i) ta' interess u jiġi purifikat.

▼M5

13. Id-dejta għal tessut wieħed għal kull annimal minn imballaġġi/ligazzjonijiet diversi normalment tiġi aggregata, u l-frekwenza tal-mutanti ġeneralment tiġi evalwata billi jintużaw total ta' bejn 10^5 u 10^7 unità li jifformaw plakka jew kolonja. Meta jintużaw metodi tal-għażla pożittiva, l-unitajiet totali li jifformaw plakka jiġu determinat b'sett separat ta' platti mhux selettivi.

14. Il-metodi tal-għażla pożittiva ġew żviluppati biex titħaffef l-identifikazzjoni tal-mutazzjonijiet kemm fil-ġene *gpt* [ġurdien u far *gpt* delta, fenotip *gpt*⁻ (20)(22)(28)] kif ukoll il-ġene *lacZ* [Muta™Mouse jew ġurdien plażmidu *lacZ* (3)(10)(11)(30)]; filwaqt li l-mutazzjonijiet tal-ġeni *lacI* f'annimali Big Blue® jiġu identifikati permezz ta' metodu mhux selettiv li jidentifika mutanti permezz tal-ġenerazzjoni ta' plakek ikkuluriti (koħol). Il-metodoloġija tal-għażla pożittiva hija fis-seħħ ukoll sabiex tidentifika mutazzjonijiet tal-punt li jfeġġu fil-ġene *cII* tal-vettur shuttle batterjofago λ [ġurdien jew far Big Blue®, u Muta™Mouse (17)] u mutazzjonijiet imħassrin fil-ġeni λ *red* u *gam* [għażla ta' Spi ⁻ fil-ġurdien u l-far *gpt* delta (21)(22)(28)]. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata billi jinqasam in-numru ta' plakek/-plażmidi li fihom mutazzjonijiet fit-transġene bin-numru totali ta' plakek/-plażmidi rkuprati mill-istess kampjun ta' DNA. Fl-istudji ta' mutazzjoni tal-ġeni tad-DNA, il-frekwenza tal-mutanti hija l-parametru rrapportat. Barra minn hekk, frekwenza tal-mutazzjoni tista' tiġi ddeterminata bħala l-frazzjon taċ-ċelloli li jġorru mutazzjonijiet indipendenti; dan il-kalkolu jeħtieġ korrezzjoni għal espansjoni klonika permezz ta' sekwenzjar tal-mutanti rkuprati(24).

15. Il-mutazzjonijiet punteġġati fl-assaġġi tal-mutazzjoni tal-punt *lacI, lacZ, cII* u *gpt* jikkonsistu primarjament f'mutazzjonijiet tas-sostituzzjoni tal-pari bażi, mutazzjonijiet ta' bidla fil-qafas u tidħiliet/tħassiriet żgħar. Is-sehem relattiv ta' dawn it-tipi ta' mutazzjoni fost mutazzjonijiet spontanji huwa simili għal dak li deher fil-ġene endoġenu *Hprt*. Tħassiriet kbar jinqabdu biss bl-għażla Spi⁻ u l-assaġġi plażmidi *lacZ* (24). Il-mutazzjonijiet ta' interess huma mutazzjonijiet *in vivo* li jfeġġu fil-ġurdien jew fil-far. Mutazzjonijiet *in vivo* u *ex vivo*, li jistgħu jfeġġu matul l-irkupru, ir-replikazzjoni jew it-tiswija tal-fago/plażmidi huma relattivament rari, u f'xi sistemi jistgħu jkunu identifikati b'mod speċifiku, jew eskluži mis-sistema tal-għażla pożittiva/tal-ospitant batterjali.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparazzjonijiet

Għażla tal-ispeċi ta' annimali

16. Bħalissa hemm disponibbli firxa ta' mudelli ta' identifikazzjoni tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' ġrieden transġeniċi, u dawn is-sistemi ntużaw b'mod iktar mifrux minn mudelli ta' firien transġeniċi. Jekk jidher ċar li l-far huwa mudell iktar xieraq mill-ġurdien (eż. meta ssir investigazzjoni tal-mekkaniżmu ta' karċinoġenesi għal tumur li jidher biss f'firien, biex issir korrelazzjoni ma' studju dwar it-tossiċità fil-firien, jew jekk ikun magħruf li l-metaboliżmu tal-far huwa jirrappreżenta aħjar il-metaboliżmu tal-bniedem), għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' mudelli tal-far transġeniku.

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-għalf

17. Idealment, it-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperimenti għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). Għad li l-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra, l-għan għandu jkun li tinżamm umdità relattiva ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u b'sekwenza ta' kuljum ta' 12-il siegħa dawl, segwiti minn 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista illimitata ta' ilma tajjeb għax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun

▼M5

influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. L-annimali għandhom jitrabbew fi gruppi żgħar (mhux iktar minn ħamsa) tal-istess sess jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom jekk dan ikun xjentifikament iġġustifikat.

Preparazzjoni tal-annimali

18. Annimali żgħażagħ b'saħħithom li laħqu l-maturità sesswali (għalqu 8-12-il ġimgħa fil-bidu tal-kura) jiġu assenjati b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u tal-kura. L-annimali jiġu identifikati b'mod uniku. L-annimali jiġu akklimatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-inqas ħamest ijiem. Il-gaġeġ għandhom jiġu rranġati b'tali mod li l-effetti possibbli dovuti għat-tqegħid tal-gaġġa jiġu minimizzati. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju ta' kull sess.

Preparazzjoni tad-doża

19. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi jew veikoli xierqa jew jitħalltu f'dieta jew ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponimenti bit-teħid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżjokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet friski tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-dejta dwar l-istabbiltà maturix l-aċċettabbiltà tal-ħżin.

Kundizzjonijiet tat-test

Solvent/veikolu

20. Is-solvent/il-veikolu ma għandhomx jipproduċu effetti tossiċi fil-volumi tad-doża użati, u ma għandhomx ikunu ssuspettati b'reazzjoni kimika mas-sustanza kimika tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħrajn li mhumiex magħrufin sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' dejta ta' referenza li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Huwa rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem.

Kontrolli Pożittivi

21. Normalment għandhom jintużaw annimali konkurrenti bil-kontroll pożittiv. Madankollu, għal laboratorji li wrew kompetenza (ara l-paragrafu 23) u li użaw dawn l-assaġġi spiss, DNA minn annimali preċedenti kkurati bil-kontroll pożittiv jista' jkun inkluż ma' kull studju bħala konferma tas-suċċess tal-metodu. It-tali DNA mill-esperimenti fl-imgħoddi għandu jinkiseb mill-istess speċi u tessuti ta' interess, u jinħażen kif xieraq (ara l-paragrafu 36). Meta jintużaw kontrolli pożittivi konkurrenti, m'hemmx bżonn li jingħataw mill-istess rotta bħas-sustanza kimika tat-test; madankollu, il-kontrolli pożittivi għandhom ikunu magħrufin li jinduċu mutazzjonijiet f'tessut wieħed jew iktar ta' interess għas-sustanza kimika tat-test. Id-doži tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv għandhom jingħażlu sabiex jipproduċu effetti dgħajfin jew moderati li b'mod kritiku jivvalutaw il-prestazzjoni u s-sensittività tal-assaġġ. Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv u uħud mit-tessuti fil-mira tagħhom.

▼M5

Tabella 1

Eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv u uħud mit-tessuti fil-mira tagħhom

Sustanza kimika tal-kontroll pożittiv u Nru tas-CAS	Isem EINECS u Nru tal-EINECS	Karatteristiċi	Tessut fil-Mira tal-Mutazzjoni	
			Far	Ġurdien
N-Ethyl-N-nitrosourea [Nru tas-CAS 759-73-9]	N-Ethyl-N-nitro-sourea [212-072-2]	Mutaġen li jaġixxi dirett	Fwied, pulmin	Mudullun tal-għadam, kolon, epitelju koloniku, intestin, fwied, pulmun, milsa, kilwa, ċelloli granulosi tal-ovarji, ċelloli ġerminali tal-irġiel
Etil carbamate (uretan) [CAS no. 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutaġen, jeħtieġ metaboliżmu iżda jipproduċi biss effetti dgħajfin		Mudullun tal-għadam, prestonku, intestin żgħir, fwied, pulmun, milsa
2,4-Djaminotoluen [Nru tas-CAS 95-80-7]	4-Metil-m-fenilened-jamin [202-453-1]	Mutaġen, jeħtieġ metaboliżmu, pożittiv ukoll fl-assaġġ Spi⁻	Fwied	Fwied
Benżo[a]piren [Nru tas-CAS 50-32-8]	Benżo[def]krisen [200-028-5]	Mutaġen, jeħtieġ metaboliżmu	Fwied, omenta,	Mudullun tal-għadam, sider, kolon, prestonku, stonku glandolari, qalb, fwied, pulmun, ċelloli ġerminali tal-irġiel

Kontrolli negattivi

22. Il-kontrolli negattivi, ikkurati b'solvent jew veikolu waħdu, u nkella kkurati bl-istess mod bħall-gruppi tal-kura, għandhom ikunu inklużi għal kull ħin tal-kampjunar. Fin-nuqqas ta' dejta tal-kontroll storika jew ippubblikata li turi li ma kien indott ebda effett ta' tħassir jew mutaġeniku mis-solvent/veikolu magħżul, il-kontrolli mhux ikkurati għandhom ikunu inklużi wkoll għal kull ħin tal-kampjunar sabiex tiġi stabbilita aċċettabbiltà tal-kontroll tal-veikolu.

Verifika tal-profiċjenza tal-laboratorju

23. Il-kompetenza f'dawn l-assaġġi għandha tiġi stabbilita billi tintwera l-ħila ta' riproduzzjoni tar-riżultati mistennija minn dejta ppubblikata (24) għal: 1) frekwenzi tal-mutanti b'sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfin) bħal dawk elenkati fit-Tabella 1, nonmutaġeni, u kontrolli tal-veikolu; u 2) irkupru tat-transġene minn DNA ġenomiku (eż. effiċjenza fl-imballaġġ).

Sekwenzjar tal-mutanti

24. Għal applikazzjonijiet regolatorji, is-sekwenzjar tad-DNA tal-mutanti mhuwiex meħtieġ, b'mod partikolari meta jinkiseb riżultat ċar pożittiv jew negattiv. Madankollu, id-dejta tas-sekwejzjar tista' tkun utli meta tkun osservata varjazzjoni għolja bejn l-individwi. F'dawn il-każijiet, is-sekwenzjar jista' jintuża biex jitwarrbu l-possibilitajiet ta' jackpots jew avvenimenti klonali billi jiġi identifikat is-sehem ta' mutanti uniċi minn tessut partikolari. Sekwenzjar għal madwar 10 minuti għal kull tessut għal kull annimal għandu jkun biżżejjed għad-determinazzjoni sempliċi ta' jekk il-mutanti klonali jikkontribwixxux għall-frekwenza tal-mutanti; is-sekwenzjar ta'

▼M5

ammont li jasal sa 25 mutant jista' jkun meħtieġ biex tiġi korretta b'mod matematiku l-frekwenza tal-mutanti għall-klonalità. Is-sekwenzjar tal-mutanti jista' jiġi kkunsidrat ukoll meta jinstabu żidiet żgħar fil-frekwenza tal-mutanti (jiġifieri kemm jinqabżu l-valuri tal-kontroll mhux ikkurat). Differenzi fl-ispettru tal-mutanti bejn il-kolonji tal-muatnti minn annimali kkurati u mhux ikkurati jistgħu jsostnu effett mutaġeniku (29). Barra minn hekk, l-ispettri ta' mutazzjoni jistgħu jkunu utli għall-iżvilupp ta' ipoteżijiet mekkanistiċi. Meta s-sekwenzjar ikun ser jiġi inkluż bħala parti mill-protokoll tal-istudju, għandha tingħata attenzjoni speċjali fit-tfassil tat-tali studji, b'mod partikolari fir-rigward tan-numru ta' mutanti sekwenzjati għal kull kampjun, biex tinkiseb biżżejjed saħħa skont il-mudell statistiku użat (ara l-paragrafu 43).

PROĊEDURA

In-Numru u s-Sess tal-Annimali

25. In-numru ta' annimali għal kull grupp għandu jkun determinat minn qabel biex ikun biżżejjed ħalli jipprovdi s-saħħa statistika meħtieġa biex tal-inqas jiġi identifikat irdoppjar fil-frekwenza tal-mutanti. Id-daqsijiet tal-grupp ser ikunu jikkonsistu f'minimu ta' ħames annimali; madankollu, jekk is-saħħa statistika ma tkunx biżżejjed, in-numru ta' annimali għandu jiżdied kif meħtieġ. Normalment għandhom jintużaw annimali rġiel. Jista' jkun hemm każijiet li fihom l-ittestjar ta' nisa biss ikun iġġustifikat; pereżempju, meta jiġu ttestjati mediċini speċifiċi għal nisa bnedmin, jew meta jiġi investigat il-metaboliżmu speċifiku għan-nisa. Jekk ikun hemm biżżejjed differenzi bejn is-sessi f'termini ta' tossiċità jew metaboliżmu, f'dak il-każ ikun hemm bżonn kemm ta' rġiel kif ukoll ta' nisa.

Il-Perjodu tal-Għoti

26. Fuq il-bażi tal-osservazzjonijiet li l-mutazzjonijiet jakkumulaw ma' kull kura, hemm bżonn ta' skeda b'dożaġġ ripetut, b'kuri ta' kuljum għal perjodu ta' 28 jum. Ġeneralment dan jitqies li huwa aċċettabbli kemm għall-produzzjoni ta' akkumulazzjoni suffiċjenti ta' mutazzjonijiet minn mutaġeni dgħajfin, kif ukoll għall-għoti ta' żmien adegwat għall-esponiment sabiex jiġu identifikati mutazzjonijiet f'organi bi proliferazzjoni baxxa. Skedi alternattivi tal-kura jistgħu jkunu xierqa għal ċerti evalwazzjonijiet, u dawn l-iskedi tad-dożaġġ alternattivi għandhom ikunu ġġustifikati xjentifikament fil-protokoll. Il-kuri ma għandhomx ikunu iqsar miż-żmien meħtieġ għall-induzzjoni sħiħa tal-enżimi metabolizzanti rilevanti kollha, u kuri iqsar jistgħu jkunu jeħtieġu l-użu ta' bosta żminijiet tal-kampjunar li jkunu xierqa għal organi b'rati differenti ta' proliferazzjoni. Xorta waħda dejjem għandha tintuża l-informazzjoni kollha disponibbli (eż. dwar it-tossiċità ġenerali jew il-metaboliżmu u l-farmakokinetika) meta jiġi ġġustifikat protokoll, speċjalment meta jkun hemm devjazzjoni mir-rakkomandazzjonijiet standard ta' hawn fuq. Filwaqt li jistgħu jżidu s-sensittività, durati tal-kura itwal minn 8 ġimgħat għandhom jiġu spjegati b'mod ċar u ġġustifikati, peress li żminijiet itwal tal-kura jistgħu jipproduċu żieda apparenti fil-frekwenza tal-mutanti permezz ta' espansjoni klonali (29).

Livelli tad-Doża

27. Il-livelli tad-doża għandhom ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studju ta' sejbien tal-medda tad-doża li jkejjel it-tossiċità ġenerali li ngħatat mill-istess rotta ta' esponiment, jew fuq ir-riżultati ta' studji preżistenti dwar it-tossiċità sottoakuta. Jistgħu jintużaw annimali mhux transġeniċi tal-istess razza ta' rodituri għad-determinazzjoni tal-meded tad-doża. Fit-test ewlieni, sabiex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju sħiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 22) u tal-inqas tliet livelli

▼M5

tad-doża b'intervalli xierqa, ħlief meta tkun intużat id-doża limitu (ara l-paragrafu 28). L-ogħla doża għandha tkun id-Doża Massima Tollerata (MTD). L-MTD hija definita bħala d-doża li tipproduċi sinjali ta' tossiċità b'tali mod li livelli ogħla tad-doża, fuq il-bażi tal-istess skeda tad-dożaġġ, jipproduċu letalità. Is-sustanzi kimiċi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi mhux tossiċi baxxi (bħal ormoni u mitoġeni), u sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni ta' proprjetajiet tossikokinetiċi jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' tfassil tad-dożi u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ. Il-livelli tad-doża użati għandhom ikopru medda mill-massimu sa tossiċità baxxa jew ineżistenti.

Test tal-limitu

28. Jekk esperimenti dwar is-sejbien tal-medda tad-doża, jew dejta eżistenti minn razez ta' rodituri relatati, jindikaw li skeda tal-kura ta' tal-inqas id-doża limitu (ara iktar 'l isfel) ma tipproduċi ebda effetti tossiċi osservabbli, u jekk ma tkunx mistennija ġenotossiċità fuq il-bażi ta' dejta minn sustanzi kliniċi strutturalment relatati, f'dak il-każ jista' ma jitqiesx li hemm bżonn ta' studju sħiħ billi jintużaw tliet livelli tad-doża. Għal perjodu tal-għoti ta' 28 jum (jiġifieri 28 kura ta' kuljum), id-doża limitu hija ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Għal perjodi tal-għoti ta' 14-il jum jew inqas, id-doża limitu hija ta' 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum (l-iskedi tad-dożaġġ li jvarjaw minn 28 kura ta' kuljum għandhom jiġu ġġustifikati b'mod xjentifiku fil-protokoll; ara l-paragrafu 26).

L-Għoti tad-Doża

29. Normalment, is-sustanza kimika tat-test tingħata b'gavage billi jintuża tubu fl-istonku jew kannula xierqa ta' intubazzjoni. B'mod ġenerali, meta jitfassal assaġġ għandha tiġi kkunsidrata r-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem. Għalhekk, rotot oħrajn ta' esponiment (bħal ilma tajjeb għax-xorb, taħt il-ġilda, ġol-vina, topikali, teħid man-nifs, intratrakeali, mad-dieta, jew impjant) jistgħu jkunu aċċettabbli meta jkunu jistgħu jiġu ġġustifikati. Tilqima intraperitoneali mhijiex rakkomandata peress li mhijiex rotta fiżjoloġikament rilevanti ta' esponiment tal-bniedem. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew tilqima f'darba waħda jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum ma għandux jaqbeż iż-2 ml/100 g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ogħla minn dan għandu jiġi ġġustifikat. Ħlief għal sustanzi kimiċi irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti mgħarrqin f'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni ħalli jiġi żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

Żmien tal-Kampjunar

Ċelloli Somatiċi

30. Iż-żmien tal-kampjunar huwa varjabbli kritiku għaliex huwa ddeterminat mill-perjodu meħtieġ sabiex il-mutazzjonijiet jiġu fissi. Dan il-perjodu huwa speċifiku għat-tessut u jidher li huwa relatat mal-ħin tad-dawran tal-popolazzjoni taċ-ċelloli, bil-mudullun tal-għadam u l-intestin li għandhom ripsons rapidu u l-fwied ferm inqas. Kompromess xieraq għall-kejl ta' frekwenzi mutanti kemm f'tessuti bi proliferazzjoni rapida kif ukoll dawk bi proliferazzjoni iktar bil-mod huwa kuri kuljum għal 28 jum konsekuttiv (kif indikat fil-paragrafu 26) u kampjunar tliet ijiem wara l-aħħar kura; għad li l-frekwenza massima tal-mutanti tista' ma tfeġġix f'tessuti bi proliferazzjoni bil-mod f'dawn il-kundizzjonijiet. Jekk it-tessuti bi proliferazzjoni bil-mod ikunu ta' importanza partikolari, f'dak il-każ żmien tal-kampjunar iktar tard ta' 28 jum wara l-perjodu tal-għoti ta' 28 jum jista' jkun iktar adattat (16)(29). F'xi każijiet, iż-żmien tal-kampjunar iktar tard jieħu post iż-żmien ta' kampjunar ta' 3 ijiem, u jkun jeħtieġ ġustifikazzjoni xjentifika.

▼M5

Ċelloli ġerminali

31. L-assaġġi ta' TGR huma adattati għall-istudju tal-induzzjoni tal-mutazzjoni tal-ġeni f'ċelloli ġerminali fl-irġiel (7)(8)(27), li fihom it-twaqqit u l-kinetika tal-ispermatoġenesi ġew definiti sew (27). In-numri inferjuri ta' ova disponibbli għal analiżi, anki wara superovulazzjoni, u l-fatt li ma hemm ebda sinteżi tad-DNA fl-ooċite, jipprekludu d-determinazzjoni tal-mutazzjoni f'ċelloli ġerminali tan-nisa bl-użu ta' assaġġi transġeniċi (31).

32. Iż-żminijiet tal-kampjunar għaċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel għandhom jingħażlu b'tali mod li jittieħed kampjun tal-medda tat-tipi ta' ċelloli esposti fi ħdan l-iżvilupp taċ-ċelloli ġerminali, u b'hekk l-istadju fil-mira fil-kampjunar ikun ġie espost biżżejjed. Iż-żmien għall-progressjoni taċ-ċelloli ġerminali li qed jiżviluppaw minn ċelloli staminali spermatogonjali sa sperma matura li tilħaq il-vas deferens/epididimi cauda huwa ta' ~49 jum għall-ġrieden (36) u ~70 jum għall-firien (34)(35). Wara esponiment għal 28 jum b'perjodu ta' kampjunar sussegwenti ta' tliet ijiem, l-isperma akkumulata miġbura mill-vas deferens/epididimi cauda (7)(8) ser tirrappreżenta popolazzjoni ta' ċelloli esposti matul madwar il-fażi aħħarija tal-ispermatoġenesi, li tinkludi l-perjodu mejotiku u postmejotiku, iżda mhux il-perjodu spermatogonjali jew taċ-ċelloli staminali. Sabiex jittieħed kampjun adegwat taċ-ċelloli fil-vas deferens/epididimi cauda li kienu ċelloli staminali spermatogonjali matul il-perjodu tal-esponiment, hemm bżonn ta' żmien addizzjonali tal-kampjunar ta' tal-inqas 7 ġimgħat (ġrieden) jew 10 ġimgħat (firien) wara li tintemm il-kura.

33. Ċelloli estruži minn tubuli seminiferuži wara skeda ta' 28 + 3 ijiem jinvolvu popolazzjoni mħallta arrikkita għall-istadji kollha taċ-ċelloli ġerminali fil-fażi tal-iżvilupp (7)(8). Il-kampjunar ta' dawn iċ-ċelloli għall-identifikazzjoni tal-mutazzjoni tal-ġeni ma jipprovdix valutazzjoni preċiża tal-istadji li fihom jiġu indotti l-mutazzjonijiet taċ-ċelloli ġerminali daqs kemm tista' tinkiseb mill-kampjunar tal-ispermatożoa mill-vas deferens/epididimi cauda (peress li hemm medda ta' tipi ta' ċelloli ġerminali kampjunati mit-tubuli, u ser ikun hemm xi ċelloli somatiċi li jikkontaminaw din il-popolazzjoni ta' ċelloli). Madankollu, il-kampjunar ta' ċelloli minn tubuli seminiferuži minbarra l-ispermatożoa mill-vas deferens/epididimi cauda wara skeda ta' kampjunar ta' 28 + 3 jum biss jipprovdi ċerta kopertura taċ-ċelloli esposti tul il-maġġoranza tal-fażijiet tal-iżvilupp taċ-ċelloli ġerminali, u jista' jkun utli għall-identifikazzjoni ta' xi mutaġeni taċ-ċelloli ġerminali.

Osservazzjonijiet

34. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali tal-inqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u jiġi kkunsidrat il-perjodu bl-ogħla livell ta' effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni tas-saħħa tal-annimali għandha tiġi rreġistrata. Tal-inqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu tal-inqas darba fil-ġimgħa, u fis-sagrifiċċju. Il-kejliet tal-konsum tal-ikel għandu jsir tal-inqs darba kull ġimgħa. Jekk is-sustanza tat-test tingħata permezz tal-ilma tajjeb għax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-inqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanizzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (23).

▼M5

Ġbir tat-Tessuti

35. Ir-raġuni għall-ġbir tat-tessuti għandha tkun definita biċ-ċar. Peress li mhuwiex possibbli li tiġi studjata l-induzzjoni tal-mutazzjoni fi prattikament l-ebda studju, l-għażla tat-tessuti li għandhom jinġabru għandha tkun imsejsa fuq ir-raġuni għat-twettiq tal-istudju u kwalunkwe dejta eżistenti dwar mutaġeniċità, karċinoġeniċità jew tossiċità għas-sustanza kimika investigata. Fatturi importanti li għandhom jiġu kkunsidrati għandhom jinkludu r-rotta tal-amministrazzjoni (fuq il-bażi tar-rotta/rotot probabbli ta' esponiment għall-bniedem), id-distribuzzjoni mbassra tat-tessuti, u l-mekkaniżmu ta' azzjoni possibbli. Fin-nuqqas ta' kwalunkwe informazzjoni ta' sfnod, għandhom jinġabru bosta tessuti somatiċi li jistgħu jkunu ta' interess. Dawn għandhom jirrappreżentaw tessuti bi proliferazzjoni rapida, bi proliferazzjoni bil-mod, u tas-sit ta' kuntatt. Barra minn hekk, għandhom jinġabru u jinħażnu spermatożoa mill-vas deferens/epididimi cauda u ċelloli ġerminali fil-fażi tal-iżvilupp mit-tubuli seminiferuži (kif deskritti fil-paragrafi 32 u 33) fil-każ li fil-ġejjieni jkun hemm bżonn ta' analiži tal-mutaġeniċità taċ-ċelloli ġerminali. Għandhom jinkisbu l-piżijiet tal-organi, u għall-organi l-kbar, għandha tinġabar l-istess żona mill-annimali kollha.

Il-Ħżin tat-Tessuti u d-DNA

36. It-tessuti (jew omoġenati tat-tessuti) għandhom jinħażnu f'– 70 °C jew inqas u jintużaw għall-iżolament tad-DNA fi żmien 5 snin. DNA iżolat, maħżun imkessaħ f'4 °C f'bafer xieraq, għandu jintuża b'mod ottimali għall-analiži tal-mutazzjoni fi żmien sena.

Għażla tat-Tessuti għal Analiži tal-Mutanti

37. L-għażla tat-tessuti għandha tkun ibbażata fuq kunsiderazzjonijiet bħal: 1) ir-rotta tal-amministrazzjoni jew is-sit tal-ewwel kuntatt (eż. l-istonku glandolari jekk l-għoti jsir b'mod orali, il-fwied jekk l-għoti jsir bit-teħid man-nifs, jew il-ġilda jekk intużat applikazzjoni topikali); u 2) parametri farmakokinetiċi osservati fi studji dwar it-tossiċità ġenerali, li jindikaw dispożizzjoni żamma jew akkumulazzjoni ta' tessut, jew l-organi fil-mira għat-tossiċità. Jekk l-istudji jsiru bħala segwitu għal studji dwar il-karċinoġeniċità, għandhom jiġu kkunsidrati t-tessuti fil-mira għall-karċinoġeniċità. L-għażla tat-tessuti għal analiži għandha timmassimizza l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li huma mutaġeni *in vitro* li jaġixxu b'mod dirett, metabolizzati malajr, ferm reattivi jew ftit li xejn assorbiti, jew dawk li għalihom it-tessut fil-mira huwa determinat mir-rotta tal-amministrazzjoni (6).

38. Fin-nuqqas ta' informazzjoni ta' sfond u filwaqt li jittieħed f'kunsiderazzjoni s-sit ta' kuntatt dovut għar-rotta tal-amministrazzjoni, il-fwied u tal-inqas tessut wieħed b'diviżjoni rapida (eż. stonku glandolari, mudullun tal-għadam) għandhom jiġu evalwati għal mutaġeniċità. F'ħafna każijiet, ir-rekwiżiti ta' hawn fuq jistgħu jinkisbu mill-analiži ta' żewġ tessuti magħżulin bir-reqqa, iżda f'xi każijiet, ikun hemm bżonn tlieta jew iktar. Jekk hemm raġunijiet għal thassib speċifiku dwar l-effetti taċ-ċelloli ġerminali, inklużi risponsi pożittivi f'ċelloli somatiċi, it-tessuti taċ-ċelloli ġerminali għandhom jiġu evalwati għal mutazzjonijiet.

Metodi tal-Kejl

39. Metodi standard tal-laboratorju jew ippubblikati għall-identifikazzjoni ta' mutanti huma disponibbli għall-mudelli transġeniċi rakkomandati: batterjofago lambda u plażmidi *lacZ* (30); ġrieden *lacI* (2)(18); ġrieden *gpt* delta (22); firien *gpt* delta (28); *cII* (17). Il-modifiki għandhom jiġu ġġustifikati u dokumenti kif xieraq. Id-dejta minn imballaġġi multipli tista' tiġi aggregata u tintuża biex jintlaħaq numru adegwat ta' plakek jew kolonji. Madankollu, il-bżonn ta' numru ikbar ta' reazzjonijiet tal-imballaġġ biex jintlaħaq in-numru xieraq ta' plakek jista' jkun indikazzjoni ta' kwalità batuta tad-DNA. F'dawn il-każijiet, id-dejta għandha tiġi kkunsidrata bir-reqqa għaliex tista' ma tkunx affidabbli. In-numru totali ottimali ta' plakek jew kolonji

▼M5

għal kull kampjun tad-DNA huwa rregolat mill-probabilità statistika ta' identifikazzjoni ta' biżżejjed numri ta' mutanti bi frekwenza partikolari ta' mutanti spontanji. B'mod ġenerali, hemm bżonn ta' minimu ta' 125 000 sa 300 000 plakka jekk il-frekwenza ta' mutanti spontanji tkun fl-ordni ta' 3×10^{-5} (15). Għall-assaġġ *lacI* Big Blue®, huwa importanti li jintwera li l-medda sħiħa ta' fenotipi tal-kulur tal-mutanti tista' tiġi identifikata permezz tal-inklużjoni ta' kontrolli tal-kulur xierqa konkurrenti ma' kull platt. It-tessuti u l-kampjuni riżultanti (oġġetti) għandhom jiġu pproċessati u analizzati billi jintuża disinn blokk, li fihom l-oġġetti mill-grupp tal-kontroll tal-veikolu/tas-solvent, il-grupp tal-kontroll pożittiv (jekk jintuża) jew id-DNA tal-kontroll pożittiv (fejn xieraq), u l-gruppi kollha tal-kura huma pproċessati flimkien.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-Riżultati

40. Dejta dwar l-annimali individwali għandha tiġi ppreżentata f'forma ta' tabelli. L-unità sperimentli hija l-annimal. Ir-rapport għandu jinkludi n-numru totali ta' unitajiet li jifformaw plakka (pfu) jew unitajiet li jifformaw kolonja (cfu), in-numru ta' mutanti, u l-frekwenza tal-mutanti għal kull tessut minn kull annimal. Jekk hemm bosta reazzjonijiet tal-imballaġġ/salvataġġ, għandu jiġi rrapportat in-numru ta' reazzjonijiet għal kull kampjun tad-DNA. Filwaqt li d-dejta għal kull reazzjoni individwali għandha tinżamm, il-pfu jew is-cfu biss iridu jiġu rrapportati. Għandha tiġi rrapportata d-dejta dwar it-tossiċità u s-sinjali kliniċi skont il-paragrafu 34. Kwalunkwe riżultat ta' sekwenzjar għandu jiġi ppreżentat għal kull mutant analizzat, u għandhom jintwerew il-kalkoli tal-frekwenza tal-mutazzjoni li rriżultaw għal kull annimal u tessut.

Evalwazzjoni Statistika u Interpretazzjoni tar-Riżultati

41. Hemm diversi kriterji għad-determinazzjoni ta' riżultat pożittiv, bħal żieda relatata mad-doża fil-frekwenza tal-mutanti, jew żieda ċara fil-frekwenza tal-mutanti fi grupp ta' doża wieħed meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll tas-solvent/veikolu. Tal-inqas tliet gruppi tad-doża kkurati għandhom jiġu analizzati sabiex tiġi pprovduta biżżejjed dejta għal analiżi tar-rispons għad-doża. Filwaqt li r-relevanza bijoloġika tar-riżultati għandha tkun il-kunsiderazzjoni primarja, jistgħu jintużaw metodi statistiċi xierqa bħala għajnuna fl-evalwazzjoni tar-riżultati tat-test (4)(14)(15)(25)(26). It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal bħala l-unità sperimentali.

42. Sustanza kimika tat-test li għaliha r-riżultati ma jissodisfawx il-kriterji ta' hawn fuq fi kwalunkwe tessut titqies mhux mutaġenika f'dan l-assaġġ. Għal relevanza bijoloġika ta' riżultat negattiv, l-esponiment għat-tessut għandu jiġi kkonfermat.

43. Għal analiżijiet tas-sekwenzjar tad-DNA, hemm disponibbli għadd ta' approċċi statistiċi biex jassistu fl-interpretazzjoni tar-riżultati (1)(5)(9)(19).

44. Kunsiderazzjoni ta' jekk il-valuri osservati humiex fi ħdan jew barra l-medda ta' kontroll storiku tista' tipprovdi gwida meta tiġi evalwata s-sinifikanza bijoloġika tar-rispons (32).

▼M5

Rapport tat-test

45. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— id-dejta ta' identifikazzjoni u n-nru tas-CAS, jekk ikunu magħrufin,

— is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli,

— l-għamla fiżika u l-purità,

— il-proprjetajiet fiżjokimiċi rilevanti għat-twettiq tal-istudju,

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Solvent/veikolu:

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu,

— is-solubilità u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħruf,

— il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-teħid man-nifs,

— id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż., l-istabbiltà, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali).

Annimali tat-test:

— l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla,

— in-numru, l-età u s-sess tal-annimali,

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija, id-dieta, eċċ.,

— il-piż individwali tal-annimali fil-bidu tat-test, inklużi l-medda tal-piż tal-ġisem, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv (veikolu/solvent),

— dejta mill-istudju ta' sejbien tal-medda,

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża,

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test,

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test,

— ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni,

— metodi għall-kejl tat-tossiċità tal-annimali, inklużi, fejn disponibbli, l-analiżijiet istopatoloġiċi jew ematoloġiċi u l-frekwenza li biha saru l-osservazzjonijiet u ttieħdu l-piżijiet tal-ġisem tal-annimali,

— metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laħqet it-tessut fil-mira, jew ċirkolazzjoni ġenerali, jekk inkisbu riżultati negattivi,

▼M5

— id-doża propja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tajjeb għax-xorb (ppm), jekk applikabbli,

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u l-ilma,

— deskrizzjoni dettaljata tal-iskedi tal-kura u l-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet,

— il-metodu tal-ewtanażja,

— il-proċeduri għall-iżolament u l-preservazzjoni tat-tessuti,

— il-metodi għall-iżolament tad-DNA ġenomiku tar-rodituri, b'salvataġġ tat-transġene minn DNA ġenomiku, u t-trasferiment ta' DNA transġeniku għal ospitant batterjali,

— is-sors u n-numri tal-lott taċ-ċelloli, il-kitts u r-reaġenti kollha (fejn applikabbli),

— il-metodi għall-enumerar tal-mutanti,

— il-metodi għall-analiżi molekolari tal-mutanti u l-użu fil-korrezzjoni għall-klonalità u/jew il-kalkolu tal-frekwenzi tal-mutazzjoni, jekk applikabbli.

Riżultati:

— il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità,

— il-piżijiet tal-ġisem u l-organi fis-sagrifiċċju,

— għal kull tessut/annimal, in-numru ta' mutanti, in-numru ta' plakek jew kolonji evalwati, il-frekwenza tal-mutanti,

— għal kull grupp ta' tessuti/annimali, in-numru ta' reazzjonijiet tal-imballaġġ għal kull kampjun tad-DNA, in-numru totali ta' mutanti, il-frekwenza medja tal-mutanti, id-devjazzjoni standard,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli,

— għal kull tessut/annimal, in-numru ta' mutanti indipendenti u l-frekwenza medja tal-mutazzjoni, fejn saret analiżi molekolari tal-mutazzjonijiet,

— dejta ta' kontroll negattiv konkurrenti u storiku b'meded, medji u devjazzjonijiet standard,

— dejta ta' kontroll pożittiv konkurrenti (jew kontroll pożittiv tad-DNA mhux konkurrenti),

— determinazzjonijiet analitiċi, jekk disponibbli (eż. konċentrazzjonijiet tad-DNA użati fl-imballaġġ, dejta dwar is-sekwenzjar tad-DNA),

— l-analiżijiet statistiċi u l-metodi applikati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjoni

▼**M5**

TAGHRIF

(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res*., 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice' *, Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

(8) Douglas, G.R*.,* J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res*., 388(2-3): 197-212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*', Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res*., 543: 125-136.

(13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, **705: 96-106**.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253-259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772-778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi — and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi ¯ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Pariġi.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/-MONO(2009)7, OECD, Pariġi.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164-193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71-78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141-151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, Stati Uniti, pp. 391–410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1-2): 117-123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/-MONO(2011)20, OECD, Pariġi.

(34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198-236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, il-Pajjiżi l-Baxxi, pp. 1071-1148.

(36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET:

Perjodu ta' għoti: il-perjodu totali li matulu annimal jingħata d-doża.

Sostituzzjoni ta' pari bażi: tip ta' mutazzjoni li tikkaġuna s-sostituzzjoni ta' bażi tan-nukleotid tad-DNA ma' bażi oħra tan-nukleotid tad-DNA.

Kapsida: il-qoxra tal-proteina li tiksi partikula ta' vajrus.

Sustanza kimika: sustanza jew taħlita.

Espansjoni klonali: il-prodzzjoni ta' ħafna ċelloli minn ċellola (mutanti) waħda.

Unità li tifforma kolonja (cfu): kejl ta' numri batterjali vijabbli.

Konkatameru: bijomolekola kontinwa twila msawra minn diversi kopji identiċi marbutin f'serje.

Sit tal-cos: segment ta' 12-nukleotid ta' DNA b'filament wieħed li jeżisti fiż-żewġt itruf tal-ġenoma b'żewġ filamenti tal-lambda batterjofago.

Tħassir: mutazzjoni li fiha jintilef nukleotid (sekwenzjali) wieħded jew iktar mill-ġenoma.

Elettroporazzjoni: l-applikazzjoni ta' polsazzjonijiet elettriċi biex tiżdied il-permeabbiltà tal-membrani taċ-ċelloli.

Ġene endoġenu: ġene nattiv għall-ġenoma.

Varjazzjoni extrabinomjali: varjabbiltà ikbar fi stimi ripetuti ta' sehem tal-popolazzjoni minn dik li tkun mistennija jekk il-popolazzjoni kellha distribuzzjoni binomjali.

Mutazzjoni ta' bdil tal-qafas: mutazzjoni ġenetika kkaġunata minn tidħiliet jew tħassiriet ta' numru ta' nukleotidi li ma jistax jinqasam b'mod sħiħ minn tlieta fi ħdan sekwenza tad-DNA li jikkodifika għal proteina/peptid.

Tidħil: iż-żieda ta' par bażi ta' nukleotid wieħed jew iktar f'sekwenza tad-DNA.

Jackpot: numru kbir ta' mutanti li feġġu permezz ta' espansjoni klonali minn mutazzjoni waħda.

Tħassiriet kbar: tħassiriet fid-DNA ta' iktar minn bosta kilobażijiet (li effettivament jiġu identifikati bl-għażla ta' Spi ⁻ u l-assaġġi ta' plażmidi lacZ).

Ligazzjon: il-kovalenti li jorbtu żewġt itruf ta' molekoli tad-DNA li jużaw ligaži tad-DNA.

Mitoġen: sustanza kimika li tistimola ċellola biex tibda diviżjoni taċ-ċelloli, li twassal għal mitoži (jiġifieri diviżjoni taċ-ċelloli).

Ġene newtrali: ġene li mhuwiex affettwat minn pressjonijiet selettivi pożittivi jew negattivi.

Imballaġġ: is-sinteži ta' partikuli fago infettivi minn preparazzjoni ta' kapsida fago u proteini tad-denb u konkatameru ta' molekoli fago tad-DNA. Użati spiss għall-imballaġġ ta' DNA kklonat f'vettur lambda (separat minn siti ta' cos) f'partikuli lambda infettuži.

Effiċjenza tal-imballaġġ: l-effiċjenza li biha l-batterjofagi mballaġġati huma rkuprati f'batterji ospitanti.

▼M5

Unità li tifforma plakek (pfu): kejl tan-numri batterjofagi vijabbli.

Mutazzjoni tal-punt: terminu ġenerali għal mutazzjoni li taffettwa biss sekwenza żgħira ta' DNA inklużi tidħiliet żgħar, ħassiriet, u sostituzzjonijiet ta' pari bażi.

Għażla pożittiva: metodu li jippermetti mutanti biss sabiex jibqgħu ħajjin.

Ġene rapportatur: ġene li l-prodott tal-ġene mutanti tiegħu huwa identifikat malajr.

Żmien tal-kampjunar: tmiem il-perjodu ta' żmien, qabel is-sagrifiċċju, li matulu s-sustanza kimika ma tingħatax u li matulha l-leżjonijiet mhux ipproċessati tad-DNA huma fissi f'mutazzjonijiet stabbli.

Vettur shuttle: vettur mibni sabiex ikun jista' jistagħna f'żewġ speċi ospitanti differenti; skont dan, id-DNA mdaħħal f'vettur shuttle jista' jiġi ttestjat jew immanipolat f'żewġ tipi ta' ċelloli differenti jew żewġ organiżmi differenti.

Sustanzaz kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-metodu ta' ttestjar.

Transġeniku: ta', relatat ma', jew li huwa organiżmu li l-ġenoma tiegħu hija alterata mit-trasferiment ta' ġene jew ġeni minn speċijiet oħrajn.

▼M7

B.59. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠLDA *IN CHEMICO*: ASSAĠĠ DIRETT TAR-REATTIVITÀ TAL-PEPTIDI (DPRA)

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 442C tal-OECD (2015). Sensitizzatur tal-ġilda jirreferi għal sustanza li sejra twassal għal reazzjoni allerġika wara kuntatt mal-ġilda kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u r-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) ([1]). Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi proċedura *in chemico* (Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi — DPRA) li tintuża sabiex tappoġġja d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda skont il-GHS tan-NU u s-CLP.

Hemm qbil ġenerali dwar l-avvenimenti bijoloġiċi ewlenin li jwasslu għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-għarfien eżistenti dwar il-mekkaniżmi kimiċi u bijoloġiċi assoċjati mas-sensitizzazzjoni tal-ġilda nġabar fil-forma ta' Passaġġ tal-Eżitu Avvers (AOP) (2), mill-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari permezz tal-avvenimenti intermedji għall-effett avvers, jiġifieri dermatite b'kuntatt allerġiku fil-bniedem jew ipersensittività b'kuntatt f'rodituri. Fi ħdan l-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, l-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari huwa l-irbit kovalenti ta' sustanzi elettrofiliċi ma' ċentri nukleofiliċi fil-proteini tal-ġilda.

Normalment, il-valutazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju. Il-metodi klassiċi bbażati fuq fniek tal-indi, it-Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek tal-Indi ta' Magnusson Kligman (GMPT) u t-Test Buehler (TM B.6 (3)), jistudjaw kemm il-fażi tal-induzzjoni kif ukoll il-fażi tal-eliċitazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. Test murin, l-Assaġġ Lokali tal-Limfonodi (LLNA, TM B.42 (4)) u ż-żewġ modifiki mhux radjuattivi tiegħu, LLNA: DA (TM B.50 (5)) u LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), li lkoll jivvalutaw ir-rispons tal-induzzjoni b'mod esklussiv, ġew aċċettati wkoll peress li jagħtu vantaġġ fuq it-testijiet fuq il-ħnieżer tal-indi f'termini tat-trattament xieraq tal-annimali u kejl oġġettiv tal-fażi tal-induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Iktar riċentement, metodi ta' ttestjar *in chemico* u *in vitro* bbażati mekkanistikament tqiesu xjentifikament validi għall-evalwazzjoni tal-periklu ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet ta' metodi mhux tal-annimali (*in silico, in chemico, in vitro*) fi ħdan Approċċi Integrati għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni (IATA) sejrin ikunu meħtieġa sabiex ikunu sostitwiti bis-sħiħ it-testijiet fuq l-annimali li jintużaw bħalissa fid-dawl tal-kopertura mekkanistika ristretta tal-AOP ta' kull wieħed mill-metodi ta' ttestjar mhux fuq l-annimali li għandna għad-dispożizzjoni bħalissa (2) (7).

Id-DPRA huwa propost sabiex jindirizza l-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, jiġifieri r-reattività tal-proteina, billi jikkwantifika r-reattività tas-sustanzi kimiċi tat-test lejn peptidi sintetiċi mudell li fihom liżina jew ċisteina (8). Imbagħad, il-valuri perċentwali ta' tnaqqis tal-peptidi taċ-ċisteina u l-liżina jintużaw sabiex sustanza titqassam f'waħda mill-erba' klassijiet ta' reattività għall-appoġġ tad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda (9).

([1]) Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1

▼M7

Id-DPRA ġie evalwat fi studju ta' validazzjoni mmexxi mil-Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għal Testijiet fuq l-Annimali (EURL ECVAM) u reviżjoni bejn il-pari indipendenti sussegwenti mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-EURL ECVAM (ESAC) u tqies li huwa xjentifikament validu (10) sabiex jintuża bħala parti minn IATA għall-appoġġ tad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda għall-fini ta' klassifikazzjoni u tikkettar tal-periklu. Eżempji dwar l-użu tad-dejta tad-DPRA flimkien ma' informazzjoni oħra huma rrapportati fit-tagħrif (11) (12) (13) (14).

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi I.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI, APPLIKABILITÀ U LIMITAZZJONIJIET

Il-korrelazzjoni tal-attività tal-proteini mal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda hija ferm stabbilita (15) (16) (17). Minkejja dan, peress li l-irbit tal-proteina jirrappreżenta avveniment ewlieni wieħed biss, li huwa l-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, informazzjoni dwar ir-reattività tal-proteina ġġenerata b'metodi ta' ttestjar u mhux ta' ttestjar jaf ma tkunx biżżejjed waħedha sabiex tinħareġ konklużjoni dwar in-nuqqas ta' potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Għaldaqstant, dejta ġġenerata b'dan il-metodu ta' ttestjar għandha tiġi kkunsidrata fil-kuntest ta' approċċi integrati bħall-IATA, biex b'hekk tiġi kkombinata ma' informazzjoni komplimentari oħra, eż. derivata minn assaġġi *in vitro* li jindirizzaw avvenimenti ewlenin oħrajn tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kif ukoll metodi mhux ta' ttestjar inkluż read-across minn analogi kimiċi.

Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża, flimkien ma' informazzjoni komplimentari oħra, sabiex jappoġġja d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/CLP) u mhux sensitizzaturi fil-kuntest tal-IATA. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jintuża waħdu, lanqas sabiex jiġu sottokategorizzati sensitizzaturi tal-ġilda f'sottokategoriji 1A u 1B kif definiti mill-GHS/CLP tan-NU, u lanqas sabiex titbassar il-potenza għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjoni tas-sikurezza. Madankollu, skont il-qafas regolatorju, riżultat pożittiv bid-DPRA jista' jintuża waħdu sabiex sustanza kimika tiġi klassifikata fil-kategorija 1 tal-GHS/CLP tan-NU.

Il-metodu ta' ttestjar tad-DPRA wera li huwa trasferibbli għal laboratorju b'esperjenza f'analiżi tal-kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja (HPLC). Il-livell ta' riproduċibbilità fil-previżjonijiet li jista' jkun mistenni mill-metodu ta' ttestjar huwa fl-ordni ta' 85 % fi ħdan il-laboratorji u 80 % bejn il-laboratorji (10). Ir-riżultati ġġenerati fl-istudju ta' validazzjoni (18) u l-istudji ppubblikati (19) b'mod ġenerali jindikaw li l-preċiżjoni tad-DPRA fid-diskriminazzjoni ta' sensitizzaturi (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/CLP) minn mhux sensitizzaturi hija ta' 80 % (N=157) b'sensittività ta' 80 % (88/109) u speċifiċità ta' 77 % (37/48) meta mqabblin mar-riżultati tal-LLNA. Id-DPRA għandu probabilità ikbar li jbassar sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri sottokategorija 1B tas-CLP/GHS tan-NU) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri sottokategorija 1A tas-CLP/GHS tan-NU) (18) (19). Madankollu, il-valuri tal-preċiżjoni mogħtijin hawnhekk għad-DPRA bħala metodu ta' ttestjar waħdu huma indikattivi biss peress li l-metodu ta' ttestjar għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħrajn ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafu 9 ta' hawn fuq. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li t-test LLNA kif ukoll testijiet oħrajn fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fl-ispeċi ta' interess, jiġifieri fil-bniedem. Fuq il-bażi tad-dejta kumplessiva disponibbli, intwera li d-DPRA huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, mekkaniżmi ta' reazzjoni, potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji in vivo) u proprjetajiet fiżikokimiċi (8) (9) (10) (19). Meħuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tad-DPRA sabiex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

▼M7

It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar sabiex jirreferi għal dak li jkun qiegħed jiġi ttestjat u mhux b'rabta mal-applikabilità tad-DPRA għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew taħlitiet. Dan il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għall-ittestjar ta' komposti tal-metall peress li dawn huma magħrufin li jirreaġixxu ma' proteini b'mekkaniżmi li mhumiex ta' rbit kovalenti. Sustanza kimika tat-test għandha tkun solubbli f'solvent xiearq f'konċentrazzjoni finali ta' 100 mM (ara l-paragrafu 18). Madankollu, is-sustanzi kimiċi tat-test li mhumiex solubbli f'din il-konċentrazzjoni xorta waħda jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjoni solubbli iktar baxxi. F'dan il-każ, xorta waħda jista' jintuża riżultat pożittiv sabiex isostni l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala sensitizzatur tal-ġilda, iżda ma għandha tinħareġ ebda konklużjoni assoluta dwar in-nuqqas ta' reattività minn riżultat negattiv. Bħalissa hemm biss informazzjoni limitata disponibbli dwar l-applikabilità tad-DPRA għal taħlitiet ta' kompożizzjoni magħrufa (18) (19). Minkejja dan, id-DPRA jitqies li huwa teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti u taħlitiet b'kompożizzjoni magħrufa (ara l-paragrafu 18). Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-mudell ta' tbassir attwali ma jistax jintuża għal taħlitiet kumplessi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew għal sustanzi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti b'reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi (jiġifieri sustanzi UVCB) minħabba l-proporzjon molari definit tas-sustanza kimika tat-test u l-peptid. Għal dan il-għan, sejjer ikollu jiġi żviluppat mudell ġdid ta' tbassir imsejjes fuq approċċ gravimetriku. F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabilità tal-metodu ta' ttestjar għal kategoriji speċifiċi ta' sustanzi kimiċi, il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi ta' sustanzi kimiċi.

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa metodu *in chemico* li ma jkoprix sistema metabolika. Sustanzi kimiċi li jeħtieġu bijoattivazzjoni enzimatika sabiex jeżerċitaw il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda tagħhom (jiġifieri proapteni) ma jistgħux jiġu individwati mill-metodu ta' ttestjar. Sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi wara trasformazzjoni abijotika (jiġifieri preapteni) huma rrapportati li f'xi każijiet jiġu individwati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar (18). Fid-dawl ta' dan li ntqal hawn fuq, riżultati negattivi miksubin bil-metodu ta' ttestjar għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tal-limitazzjonijiet stipulati u b'rabta ma' sorsi ta' informazzjoni oħrajn fi ħdan il-qafas ta' IATA. Sustanzi kimiċi tat-test li ma jorbtux b'mod kovalenti mal-peptid iżda jippromwovu l-ossidazzjoni tiegħu (jiġifieri dimerizzazzjoni taċ-ċisteina) jistgħu jwasslu għal potenzjal ta' sopravalutazzjoni tat-tnaqqis tal-peptidi, li jirriżulta fi tbassir possibbli ta' foloz pożittivi u/jew assenjament għal klassi ta' reattività ogħla (ara l-paragrafi 29 u 30).

Kif deskritt, id-DPRA jsostni d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda. Madankollu, għandu l-potenzjal li jikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni (11) ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA. Madankollu, hemm bżonn li jsir iktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' dejta mill-bniedem, sabiex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tad-DPRA jistgħu jinformaw valutazzjoni tal-potenza.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Id-DPRA huwa metodu *in chemico* li jikkwantifika l-konċentrazzjoni li jifdal ta' peptid li fih ċisteina jew liżina wara inkubazzjoni ta' 24 siegħa bis-sustanza kimika tat-test f'25 ± 2.5 °C. Il-peptidi sintetiċi fihom fenilalanina sabiex tgħin fl-individwazzjoni. Konċentrazzjoni relattiva ta' peptidi hija mkejla minn kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja (HPLC) b'elwizzjoni gradjenti u detezzjoni tal-UV f'220 nm. Imbagħad, il-valuri tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi taċ-ċisteina u liżina jiġu kkalkolati u jintużaw f'mudell ta' tbassir (ara l-paragrafu 29) li jippermettu li s-sustanza kimika tat-test tiġi assenjata għal waħda mill-erba' klassijiet ta' reattività għall-appoġġ tad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi u mhux sensitizzaturi.

▼M7

Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu ta' ttestjar f'dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-għaxar sustanzi ta' profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 2.

PROĊEDURA

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll DB-ALM DPRA Nru 154 (20) li jirrappreżenta l-protokoll użat għall-istudju ta' validazzjoni koordinat mill-ECVAM tal-EURL. Huwa rakkomandat li dan il-protokoll jintuża meta jiġi implimentat u jintuża l-metodu fil-laboratorju. Din li ġejja hija deskrizzjoni tal-komponenti u l-proċeduri ewlenin ta' ttestjar għad-DPRA. Jekk jintuża ssettjar alternattiv tal-HPLC, għandha tintwera l-ekwivalenza tiegħu għall-issettjar ivvalidat deskritt fil-protokoll DB-ALM (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2).

Preparazzjoni tal-peptidi li fihom iċ-ċisteina jew il-liżina

Soluzzjonijiet ewlenin ta' ċisteina (Ac-RFAACAA-COOH) u liżina (Ac-RFAAKAA-COOH) li fihom peptidi sintetiċi ta' purità ogħla minn 85 % u idealment fil-medda ta' 90-95 %, għandhom jitħejjew ġodda eżatt qabel ma jiġu inkubati mas-sustanza kimika tat-test. Il-konċentrazzjoni finali tal-peptid taċ-ċisteina għandha tkun ta' 0.667 mM f'bafer tal-fosfat b'pH ta' 7.5 filwaqt li l-konċentrazzjoni finali tal-peptid tal-liżina għandha tkun ta' 0.667 mM f'bafer tal-aċetat tal-ammonju b'pH ta' 10.2. Is-sekwenza tas-sessjoni tal-HPLC għandha tiġi stabbilita sabiex il-ħin tal-analiżi tal-HPLC jinżamm għal inqas minn 30 siegħa. Għall-issettjar tal-HPLC użat fl-istudju ta' validazzjoni u deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, jistgħu jiġu akkomodati sa 26 kampjun tal-analiżi (li jinkludu s-sustanza kimika tat-test, il-kontroll pożittiv u n-numru xieraq ta' kontrolli tas-solvent fuq il-bażi tan-numru ta' solventi individwali użati fit-test, ilkoll ittestjati fi triplikat), f'sessjoni waħda tal-HPLC. Ir-repliki kollha analizzati fl-istess sessjoni għandhom jużaw l-istess soluzzjonijiet ewlenin tal-peptid taċ-ċisteina u l-liżina. Huwa rakkomandat li jingħataw provi ta' lottijiet ta' peptidi individwali għas-solubilità xierqa qabel ma jintużaw.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test f'solvent xieraq għandha tiġi vvalutata qabel ma jsir l-assaġġ wara l-proċedura ta' solubilizzazzjoni deskritta fil-protokoll DB-ALM tad-DPRA (20). Solvent xieraq jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test għalkollox. Peress li fid-DPRA s-sustanza kimika tat-test tiġi inkubata f'eċċess kbir b'peptidi taċ-ċisteina jew il-peptidi tal-liżina, spezzjoni viżwali tal-ifformar ta' soluzzjoni ċara titqies li hija biżżejjed sabiex jiġi żgurat li ġiet dissolta s-sustanza kimika tat-test (u l-komponenti kollha tagħha fil-każ ta' ttestjar ta' sustanza jew taħlita multikostitwenti). Solventi xierqa huma aċetonitril, ilma, taħlita 1:1 ilma:aċetonitril, isopropanol, aċetonaċeton jew taħlita 1:1 aċeton:aċetonitril. Jistgħu jintużaw solventi oħrajn diment li ma jħallux impatt fuq l-istabilità tal-peptid kif issorveljat b'kontrolli ta' referenza C (jiġifieri kampjuni kostitwiti mill-peptid waħdu dissolt fis-solvent xieraq; ara l-Appendiċi 3). Bħala l-aħħar alternattiva, jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fi kwalunkwe wieħed minn dawn is-solventi, għandu jsir tentattiv sabiex tiġi solubilizzata fi 300 µL DMSO u s-soluzzjoni li tirriżulta tiġi dilwita b'2 700 µL ta' aċetonitril u, jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli f'din it-taħlita, għandhom isiru tentattivi sabiex jiġi solubizzat l-istess ammont ta' sustanza kimika tat-test f'1 500 µL DMSO u s-soluzzjoni li jifdal b'1 500 µL ta' aċetonitril. Is-sustanza kimika tat-test għandha tintiżen minn qabel f'kunjetti tal-ħġieġ u tiġi dissolta eżatt qabel l-ittestjar b'solvent xieraq sabiex titħejja soluzzjoni ta' 100 mM. Għal taħlitiet u sustanzi multikostitwenti b'kompożizzjoni magħrufa, purità waħda għandha tiġi stabbilita mis-somma tal-proporzjon tal-kostitwenti tagħha (eskluż l-ilma), u għandu jiġi stabbilit piż molekolari apparenti wieħed billi jiġu kkunsidrati l-piżijiet molekolari individwali ta' kull komponent fit-taħlita (eskluż l-ilma) u l-proporzjonijiet individwali tagħhom. Imbagħad għandhom

▼M7

jintużaw il-purità li tirriżulta u l-piż molekolari apparenti sabiex jiġi kkalkolat il-piż tas-sustanza kimika tat-test neċessarju sabiex titħejja soluzzjoni ta' 100 mM. Għal polimeri li għalihom ma jistax jiġi stabbilit piż molekolari predominanti, il-piż molekolari tal-monomer (jew il-piż molekolari apparenti tal-bosta monomeri li jikkostitwixxu l-polimer) jistgħu jiġu kkunsidrati sabiex titħejja soluzzjoni ta' 100 mM. Madankollu, meta jiġu ttestjati taħlitiet, sustanzi multikostitwenti jew polimeri b'kompożizzjoni magħrufa, għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-ittestjar tas-sustanza kimika pura. Għal likwidi, is-sustanza kimika pura għandha tiġi ttestjata kif inhi mingħajr ebda dilwizzjoni minn qabel billi tiġi inkubata bi proporzjon molari ta' 1:10 u 1:50 bil-peptidi taċ-ċisteina u l-liżina, rispettivament. Għal solidi, is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi dissolta għall-konċentrazzjoni solubbli massima tagħha fl-istess solvent użat għat-tħejjija tas-soluzzjoni apparenti ta' 100 mM. Imbagħad għandha tiġi ttestjata kif inhi mingħajr ebda dilwizzjoni ulterjuri minn qabel billi tiġi inkubata bi proporzjon ta' 1:10 u 1:50 bil-peptidi taċ-ċisteina u l-liżina, rispettivament. Ir-riżultati konkordanti (reattivi jew mhux reattivi) bejn is-soluzzjoni apparenti ta' 100 mM u s-sustanza kimika pura għandhom jippermettu li tinħareġ konklużjoni ċara fuq ir-riżultat.

Preparazzjoni tal-kontroll pożittiv, kontrolli ta' referenza u l-kontrolli ta' koelwizzjoni

Aldeid ċinnamiku (CAS 104-55-2; ≥ 95 % purità tal-grad tal-ikel) għandu jintuża bħala l-kontroll pożittiv (PC) f'konċentrazzjoni ta' 100 mM fl-aċetonitril. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħrajn li idealment jipprovdu valuri ta' tnaqqis fil-medda medja jekk ikun hemm dejta storika disponibbli sabiex jinkisbu kriterji ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni komparabbli. Barra minn hekk, kontrolli ta' referenza (jiġifieri kampjuni li fihom biss il-peptid dissolt fis-solvent xieraq) għandhom ikunu inklużi wkoll fis-sekwenza tas-sessjoni tal-HPLC u dawn jintużaw sabiex tiġi verifikata l-idoneità tas-sistema tal-HPLC qabel ma ssir l-analiżi (kontrolli ta' referenza A), l-istabilità tal-kontrolli ta' referenza tul iż-żmien (kontrolli ta' referenza B) u sabiex jiġi verifikat li s-solvent użat sabiex tiġi dissolta s-sustanza kimika tat-test ma jħallix impatt fuq il-perċentwal ta' tnaqqis ta' peptidi (kontrolli ta' referenza Ċ) (ara l-Appendiċi 3). Il-kontroll ta' referenza xieraq għal kull sustanza kimika jintuża sabiex jiġi kkalkolat it-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi għal dik is-sustanza kimika (ara l-paragrafu 26). Barra minn hekk, għandu jkun inkluż kontroll tal-koelwizzjoni kostitwit mis-sustanza kimika tat-test waħedha għal kull waħda mis-sustanzi kimiċi tat-test analizzati fis-sekwenza tas-sessjoni sabiex tiġi individwata l-koelwizzjoni possibbli tas-sustanza kimika tat-test b'peptid tal-liżina jew taċ-ċisteina.

Inkubazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bis-soluzzjonijiet tal-peptidi taċ-ċisteina u l-liżina

Is-soluzzjonijiet tal-peptidi taċ-ċisteina u l-liżina għandhom jiġu inkubati f'kunjetti tal-ħġieġ tal-awtokampjunar bis-sustanza kimika tat-test bi proporzjon ta' 1:10 u 1:50, rispettivament. Jekk jiġi osservat preċipiatat eżatt wara li tiżdied is-soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test mas-soluzzjoni tal-peptid, minħabba solubilità milwiema baxxa tas-sustanza kimika tat-test, f'dan il-każ wieħed ma jistax ikun żgur dwar kemm is-sustanza kimika tat-test baqgħet fis-soluzzjoni sabiex tirreaġixxi mal-peptid. Għalhekk, f'każ bħal dan, riżultat pożittiv xorta waħda jista' jintuża, iżda riżultat negattiv huwa inċert u għandu jiġi interpretat bil-galbu (ara wkoll id-dispożizzjonijiet fil-paragrafu 11 għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi mhux solubbli sa konċentrazzjoni ta' 100 mM). Is-soluzzjoni tar-reazzjoni għandha titħalla fid-dlam f'25 ± 2.5 °C għal 24 ± 2 siegħa qabel ma ssir l-analiżi tal-HPLC. Kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi analizzata fi triplikat għażżewġ peptidi. Il-kampjuni jridu jiġu spezzjonati viżwalment qabel l-analiżi tal-HPLC. Jekk jiġu osservati preċipitat jew separazzjoni tal-fażi, il-kampjuni jistgħu jiġu ċentrifugati b'veloċità baxxa (100-400xg) sabiex il-preċipitat jiġi mġiegħel għal qiegħ il-kunjett bħala prekawzjoni, peress li ammonti kbar ta' preċipitat jistgħu jsoddu t-tubi jew il-kolonni tal-HPLC. Jekk tiġi osservata preċipitazzjoni jew separazzjoni tal-fażi wara l-perjodu ta' inkubazzjoni, it-tnaqqis tal-peptidi jista' jiġi sottovalutat u ma tistax tinħareġ konklużjoni dwar in-nuqqas ta' reattività b'biżżejjed kunfidenza fil-każ ta' riżultat negattiv.

▼M7

Preparazzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni standard tal-HPLC

Kurva ta' kalibrazzjoni standard għandha tiġi ġġenerata kemm għall-peptidi taċ-ċisteina kif ukoll tal-liżina. L-istandards tal-peptidi għandhom jitħejjew f'soluzzjoni ta' 20 % jew 25 % aċetonitril: bafer li juża bafer tal-fosfat (pH 7.5) għall-bafer tal-aċetat tal-ammonju u l-peptid taċ-ċisteina (pH 10.2) għall-peptid tal-liżina. L-użu ta' standards ta' dilwizzjoni serjali tas-soluzzjoni ewlenija tal-peptid (0,667 mM), 6 soluzzjonijiet tal-kalibraġġ għandhom jitħejjew sabiex ikopru l-medda minn 0.534 sa 0.0167 mM. Inbjank tal-bafer ta' dilwizzjoni għandu jkun inklż ukoll fil-kurva ta' kalibrazzjoni standard. Il-kurvi ta' kalibrazzjoni xierqa għandu jkollhom $r^2 > 0.99$.

Preparazzjoni u analiżi tal-HPLC

L-idoneità tas-sistema tal-HPLC għandha tiġi vverifikata qabel ma ssir l-analiżi. It-tnaqqis tal-peptidi jiġi ssorveljat mill-HPLC flimkien ma' detettur tal-UV (detettur b'serje ta' fotodijodi jew detettur tal-assorbiment tat-tul ta' mewġa fiss b'sinjal ta' 220 nm). Il-kolonna xierqa tiġi installata fis-sistema tal-HPLC. L-issettjar tal-HPLC deskritt fil-protokoll ivvalidat juża mikron Zorbax SB-C-182,1 mm × 100 mm × 3.5 bħala l-kolonna ppreferita. Bil-kolonna ta' faži inversa tal-HPLC, is-sistema sħiħa għandha tiġi ekwilibrata għal 30 °C b'faži A ta' 50 % (0,1 % (v/v) aċidu trifluworoaċetiku fl-ilma) u faži B ta' 50 % (0,085 % (v/v) aċidu trifluworoaċetiku fl-aċetonitril) għal tal-inqas sagħtejn qabel ma ssir is-sessjoni. L-analiżi tal-HPLC għandha ssir bl-użu ta' rata tal-fluss ta' 0,35 ml/min u gradjent lineari minn 10 % għal 25 % aċetonitril għal 10 minuti, segwita minn żieda rapida għal 90 % aċetonitril sabiex jitneħħew materjali oħrajn. Għandhom jiġu injettati volumi indaqs ta' kull standard, kampjun u kontroll. Il-kolonna għandha terġa' tiġi ekwilibrata għall-kundizzjonijiet inizjali għal 7 minuti bejn l-injezzjonijiet. Jekk tintuża kolonna ta' faži inversa differenti tal-HPLC, il-parametri tal-issettjar deskritti hawn fuq jista' jkollhom bżonn li jiġu aġġustati sabiex jiggarantixxu elwizzjoni u integrazzjoni xierqa tal-peptidi taċ-ċisteina u l-liżina, inkluż il-volum tal-injezzjoni, li jista' jvarja skont is-sistema użata (tipikament fil-medda ta' bejn 3-10 µl). Ta' min jgħid li jekk jintuża ssettjar alternattiv tal-HPLC, għandha tintwera l-ekwivalenza tiegħu għall-issettjar ivvalidat deskritt hawn fuq (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2). L-assorbità hija ssorveljata f'220 nm. Jekk jintuża detettur b'serje ta' fotodijodi, għandha tiġi rreġistrata l-assorbità f'258 nm ukoll. Ta' min jinnota li wħud mill-provvisti ta' aċetonitril jista' jkollhom impatt negattiv fuq l-istabilità tal-peptidi u dan irid jiġi vvalutat meta jintuża lott ġdid ta' aċetonitril. Il-proporzjon tal-erja tal-ogħla livell ta' 220 u l-erja tal-ogħla livell ta' 258 jista' jintuża bħala indikatur ta' koelwizzjoni. Għal kull kampjun, proporzjon fil-medda ta' proporzjon tal-erja < medja ([1]) ta' 90 % tal-kampjuni tal-kontroll < 100 % tkun indikazzjoni tajba li ma seħħitx koelwizzjoni.

Jista' jkun hemm sustanzi kimiċi tat-test li jistgħu jippromwovu l-ossidazzjoni tal-peptid taċ-ċisteina. L-ogħla livell tal-peptid taċ-ċisteina dimerizzat jista' jiġi ssorveljat viżwalment. Jekk jidher li tkun seħħet dimerizzazzjoni, din għandha titniżżel peress li tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi jista' jkun sopravvalutat u jwassal għal tbassir ta' foloz pożittivi u/jew assenjament fi klassi ta' reattività ogħla (ara l-paragrafi 29 u 30).

L-analiżi tal-HPLC għall-peptidi taċ-ċisteina u l-liżina tista' ssir b'mod parallel (jekk ikun hemm żewġ sistemi tal-HPLC disponibbli(jew f'jiem separati. Jekk l-analiżi ssir f'jiem separati, is-soluzzjonijiet kimiċi kollha tat-test għandhom jitħejjew ġodda għaż-żewġ assaġġi f'kull jum. L-analiżi għandha tiġi ssir f'ħin

([1]) Medja tfisser medja aritmetika fid-dokument kollu.

▼M7

allokat sabiex jiġi żgurat li l-injezzjoni tal-ewwel kampjun tibda 22 sa 26 siegħa wara li s-sustanza kimika tat-test tħalltet mas-soluzzjoni tal-peptidi. Is-sekwenza tas-sessjoni tal-HPLC għandha tiġi stabbilita sabiex il-ħin tal-analiżi tal-HPLC jinżamm għal inqas minn 30 siegħa. Għall-issettjar tal-HPLC użat fl-istudju ta' validazzjoni u deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, jistgħu jiġu akkomodati sa 26 kampjun tal-analiżi f'sessjoni waħda tal-HPLC (ara l-paragrafu 17 ukoll). Eżempju tat-twettiq tal-analiżi tal-HPLC huwa pprovdut fl-Appendiċi 3.

DEJTA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-Dejta

Il-konċentrazzjoni tal-peptid taċ-ċisteina jew il-liżina tiġi stabbilita b'mod fotometriku f'220 nm f'kull kampjun billi titkejjel l-erja tal-ogħla livell (erja taħt il-kurva, AUC) tal-livelli għoljin xierqa u billi tiġi kkalkolata l-konċentrazzjoni tal-peptid bl-użu tal-kurva ta' kalibrazzjoni lineari derivata mill-istandards.

It-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi huwa stabbilit f'kull kampjun billi titkejjel l-erja tal-ogħla livell u tiġi diviża bl-erja tal-ogħla livell medja tal-kontrolli ta' referenza rilevanti C (ara l-Appendiċi 3) skont il-formula deskritta hawn taħt.

$$Percent\ peptide\ depletion = \left[1 - \left(\frac{Peptide\ peak\ area\ in\ replicate\ injection}{Mean\ peptide\ peak\ area\ in\ reference\ controls\ C}\right)\right] \times 100$$

Kriterji ta' aċċettazzjoni

Sabiex sessjoni titqies valida għandhom jiġu ssodisfati l-kundizzjonijiet li ġejjin:

a) il-kurva ta' kalibrazzjoni standard għandu jkollha $r^2 > 0,99$,

b) il-valur medju tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi tat-tliet repliki għall-aldeid ċinnamiku tal-kontroll pożittiv għandu jkun ta' bejn 60.8 % u 100 % għall-peptid taċ-ċisteina u bejn 40,2 % u 69,0 % għall-peptid tal-liżina u d-devjazzjoni standard massima (SD) għar-repliki tal-kontroll pożittiv għandha tkun ta' < 14,9 % għat-tnaqqis fil-perċentwal ta' ċisteina u < 11,6 % għat-tnaqqis fil-perċentwal ta' liżina, u

c) il-konċentrazzjoni medja tal-peptidi tal-kontrolli ta' referenza A għandha tkun ta' 0,50 ± 0.05 mM u l-koeffiċjent ta' varjazzjoni (CV) tal-erji tal-ogħla livell tal-peptidi għad-disa' kontrolli ta' referenza B u Ċ fl-aċetonitril għandha tkun ta' < 15.0 %.

Jekk ma jkunx issodisfat wieħed jew iktar minn dawn il-kriterji, is-sessjoni għandha terġa' ssir.

Sabiex ir-riżultati ta' sustanza kimika tat-test jitqiesu validi għandhom jiġu ssodisfati l-kundizzjonijiet li ġejjin:

a) id-devjazzjoni standard massima għar-repliki tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun ta' <14.9 % għat-tnaqqis fil-perċentwal ta' ċisteina u <11.6 % għat-tnaqqis fil-perċentwal ta' liżina,

b) il-konċentrazzjoni medja tal-peptidi tat-tliet kontrolli ta' referenza C fis-solvent xieraq għandha tkun ta' 0.50±0.05 mM. Jekk ma jkunux issodisfati dawn il-kriterji, id-dejta għandha tiġi miċħuda u s-sessjoni għandha terġa' ssir għal dik is-sustanza kimika tat-test speċifika.

Mudell ta' tbassir

Il-valur medju ta' tnaqqis fil-perċentwal ta' liżina u ċisteina jiġi kkalkolat għal kull sustanza kimika tat-test. Tnaqqis negattiv jitqies bħala "0" meta tiġi kkalkolata l-medja. Bl-użu tal-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10/liżina 1:50 muri fit-Tabella 1, il-limitu ta' tnaqqis medju ta' 6.38 % tal-peptidi għandu jintuża sabiex isostni d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda fil-kuntest ta' IATA. L-applikazzjoni tal-mudell ta' tbassir għall-assenjament ta' sustanza kimika tat-test għal klassi ta' reattività (jiġifieri reattività baxxa, moderata u għolja) forsi tista' tkun siewja sabiex tiġi informata l-valutazzjoni tal-potenza fi ħdan il-kuntest ta' IATA.

▼M7

Tabella 1

Mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10/liżina 1:50 ([1])

Medja tat-tnaqqis fil-% ta' ċisteina u liżina	Klassi tar-reattività:	Tbassir tad-DPRA ([2])
0 % ≤ tnaqqis medju % ≤ 6,38 %	Ebda reattività jew reattività minima	Negattiv
6,38 % < tnaqqis medju % ≤ 22,62 %	Reattività baxxa	Pożittiv
22,62 % < tnaqqis medju % ≤ 42,47 %	Reattività moderata	
42,47 % < tnaqqis medju % ≤ 100 %	Reattività għolja	

([1]) In-numri jirreferu għal valuri limitu ġġenerati statistikament u ma għandhomx x'jaqsmu mal-preċiżjoni tal-kejl.
([2]) Tbassir tad-DPRA għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 12.

Jista' jkun hemm każijiet li fihom is-sustanza kimika tat-test (is-sustanza jew wieħed jew bosta mill-komponenti ta' sustanza multikostitwenti jew taħlita) tassorbi b'mod sinifikanti f'220 nm u jkollha l-istess ħin ta' ritenzjoni bħall-peptid (koelwizzjoni). Il-koelwizzjoni tista' tiġi solvita billi jiġi aġġustat bi ftit l-issettjar tal-HPLC sabiex ikompli jiġi separat il-ħin tal-elwizzjoni tas-sustanza kimika tat-test u l-peptid. Jekk jintuża ssettjar alternattiv tal-HPLC sabiex tipprova tiġi solvita l-koelwizzjoni, għandha tintwera l-ekwivalenza tiegħu għall-issettjar ivvalidat (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2). Meta sseħħ koelwizzjoni, l-ogħla livell tal-peptid ma jistax jiġi integrat u l-kalkolu tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi ma jkunx possibbli. Jekk il-koelwizzjoni tat-tali sustanzi kimiċi tat-test isseħħ kemm bil-peptidi taċ-ċisteina kif ukoll tal-liżina, l-analiżi għandha tiġi rrapportata bħala "inkonkluživa". F'każijiet li fihom il-koelwizzjoni sseħħ biss bil-peptid tal-liżina, jista' jintuża l-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10 irrapportat fit-Tabella 2.

Tabella 2

Mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10 ([1])

Tnaqqis fil-% ta' ċisteina (Cys) %	Klassi ta' reattività	Tbassir tad-DPRA ([2])
0 % ≤ tnaqqis % Cys ≤ 13,89 %	Ebda reattività jew reattività minima	Negattiv
13,89 % < tnaqqis % Cys ≤ 23,09 %	Reattività baxxa	Pożittiv
23,09 % < tnaqqis % Cys ≤ 98,24 %	Reattività moderata	
98,24 % < tnaqqis % Cys ≤ 100 %	Reattività għolja	

([1]) In-numri jirreferu għal valuri limitu ġġenerati statistikament u ma għandhomx x'jaqsmu mal-preċiżjoni tal-kejl.
([2]) Tbassir tad-DPRA għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 12.

Jista' jkun hemm każijiet oħrajn li fihom it-trikkib fil-ħin ta' ritenzjoni bejn is-sustanza kimika tat-test u wieħed mill-peptidi jkun inkomplut. F'dawn il-każijiet, il-valuri ta' tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi jista' jiġi stmat u jintuża fil-mudell ta' tbassir taċ-ċisteina 1:10/liżina 1:50, iżda s-sustanza kimika tat-test ma tistax tiġi assenjata għal klassi ta' reattività bi preċiżjoni.

▼M7

Analiżi waħda tal-HPLC kemm għall-peptid taċ-ċisteina kif ukoll tal-liżina għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta r-riżultat ikun inekwivoku. Madankollu, fi klassijiet ta' riżultati li jiġu qrib il-limitu użat sabiex jiddistingwi bejn riżultati pożittivi u negattivi (jiġifieri riżultati fil-limitu), jaf ikun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet. F'sitwazzjonijiet fejn it-tnaqqis fil-perċentwal medju jaqa' fil-medda ta' bejn 3 % sa 10 % għall-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10/liżina 1:50 jew it-tnaqqis fil-perċentwal ta' ċisteina jaqa' fil-medda ta' 9 % sa 17 % għall-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda jekk ikun hemm riżultati li ma jaqblux bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test

— Sustanza monokostitwenti

  — Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

  — Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

  — Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

  — Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

  — Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

  — Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli.

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita:

  — Karatterizzazzjoni safejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara iktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara iktar 'il fuq) tal-kostitwenti, safejn ikunu disponibbli;

  — Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

  — Il-piż molekolari jew il-piż molekolari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

  — Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

  — Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

  — Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli.

Kontrolli

— Kontroll pożittiv

  — Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

  — Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

  — Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

▼M7

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, tħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.

— Solvent/veikolu

— Is-solvent/il-veikolu użat u l-proporzjon tal-kostitwenti tiegħu, jekk applikabbli;

— Identifikazzjoni(jiet) kimika, bħall-isem/ismijiet IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżi-kokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintużaw solventi / veikoli oħrajn li mhumiex dawk imsemmijin fil-metodu ta' ttestjar u safejn ikunu disponibbli;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;

— Għall-aċetonitril, ir-riżultati tat-test tal-impatt fuq l-istabilità tal-peptid.

Preparazzjoni tal-peptidi, il-kontroll pożittiv u s-sustanza kimika tat-test

— Il-karatterizzazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-peptid (il-fornitur, il-lott, il-piż eżatt tal-peptid, il-volum miżjud għas-soluzzjoni ewlenija);

— Karatterizzazzjoni tas-soluzzjoni tal-kontroll pożittiv (il-piż eżatt tas-sustanza tal-kontroll pożittiv, il-volum miżjud għas-soluzzjoni tat-test);

— Karatterizzazzjoni tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test (il-piż eżatt tas-sustanza kimika tat-test, il-volum miżjud għas-soluzzjoni tat-test).

L-issettjar tal-istrument u l-analiżi tal-HPLC

— It-tip ta' strument tal-HPLC, il-kolonni tal-HPLC u l-prekolonni, id-detettur, l-awtokampjunatur;

— Il-parametri rilevanti għall-analiżi tal-HPLC bħat-temperatura tal-kolonna, il-volumi tal-injezzjoni, ir-rata tal-fluss u l-gradjent.

L-idoneità tas-sistema:

— L-erja tal-ogħla livell tal-peptid f'220 nm ta' kull replika standard u tal-kontroll A ta' referenza;

— Kurva ta' kalibrazzjoni lineari rappreżentata b'mod grafiku u r-r2 irrapportata;

— Il-konċentrazzjoni tal-peptid ta' kull replika tal-kontroll A ta' referenza;

— Il-konċentrazzjoni medja tal-peptidi (mM) tat-tliet kontrolli ta' referenza A, SD u CV;

— Il-konċentrazzjoni tal-peptid tal-kontroll ta' referenza A u C.

▼M7

Sekwenza tal-analiżi

— Għall-kontrolli ta' referenza:

  — L-erja tal-ogħla livell tal-peptid f'220 nm ta' kull replika B u C;

  — L-erja tal-ogħla livell medja tal-peptid f'220 nm tad-disa' kontrolli ta' referenza B u C fl-aċetonitril, SD u CV (għall-istabilità tal-kontrolli ta' referenza tul il-ħin tal-analiżi);

  — Għal kull solvent użat, l-erja tal-ogħla livell medja tal-peptidi f'220 nm tat-tliet kontrolli ta' referenza xierqa C (għall-kalkolu tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi);

  — Għal kull solvent użat, il-konċentrazzjoni ta' peptidi (mM) tat-tliet kontrolli ta' referenza xierqa C;

  — Għal kull solvent użat, il-konċentrazzjoni medja ta' peptidi (mM) tat-tliet kontrolli ta' referenza xierqa C, SD u CV.

— Għall-kontroll pożittiv:

  — L-erja tal-ogħla livell tal-peptid f'220 nm ta' kull replika;

  — It-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi ta' kull replika;

  — It-tnaqqis medju fil-perċentwal ta' peptidi tat-tliet repliki, SD u CV.

— Għal kull sustanza kimika tat-test:

  — Id-dehra tal-preċipitat fit-taħlita tar-rispons fi tmiem il-ħin tal-inkubazzjoni, jekk osservat. Jekk il-preċipitat reġa' ġie solubilizzat jew ġie ċentrifugat;

  — Il-preżenza ta' koelwizzjoni;

  — Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli;

  — L-erja tal-ogħla livell tal-peptid f'220 nm ta' kull replika;

  — It-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi ta' kull replika;

  — Il-medja tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi tat-tliet repliki, SD u CV;

  — Il-medja tal-valuri ta' tnaqqis fil-perċentwal ta' ċisteina u liżina;

  — Il-mudell ta' tbassir użat u t-tbassir tad-DPRA.

Ittestjar tal-profiċjenza

— Jekk applikabbli, il-proċedura użata sabiex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju sabiex iwettaq il-metodu ta' ttestjar (eż. billi jiġu ttestjati s-sustanzi ta' profiċjenza) jew sabiex tintwera prestazzjoni riproduċibbli tal-metodu ta' ttestjar matul iż-żmien.

Diskussjoni tar-riżultati

— Diskussjoni tar-riżultati miksubin bil-metodu ta' ttestjar tad-DPRA;

— Diskussjoni tar-riżultati tal-metodu ta' ttestjar fil-kuntest ta' IATA jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjoni

▼M7

TAGĦRIF

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

(3) Il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda.

(4) Il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness: L-Assaġġ Lokali tal-Limfonodi

(5) Il-Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi: DA.

(6) Il-Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi BrdU-ELISA

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Disponibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Disponibbli fuq: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Disponibbli fuq: http://
ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Disponibbli fuq: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta'"rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar (21).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): Sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari għal eżitu ta' interess *in vivo* (2).

Kurva ta' kalibrazzjoni: Ir-relazzjoni bejn il-valur tar-rispons sperimentali u l-konċentrazzjoni analitika (imsejħa wkoll *kurva standard*) ta' sustanza magħrufa.

Sustanza Kimika: Sustanza jew taħlita.

Koeffiċjent ta' varjazzjoni: Kejl tal-varjabbiltà li huwa kkalkolat għal grupp ta' dejta dwar ir-repliki billi d-devjazzjoni standard tiġi diviża bil-medja. Jista' jiġi mmoltiplikat b'100 għall-espressjoni bħala perċentwal.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), il-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew grupp ta' sustanzi kimiċi, li tintegra b'mod strutturat u jiżen id-dejta rilevanti kollha sabiex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-ħtieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

Avveniment ta' Inizjazzjoni Molekolari: Perturbazzjoni indotta kimikament ta' sistema bijoloġika fil-livell molekolari identifikata li hija l-avveniment tal-bidu fil-passaġġ tal-eżitu avvers.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreaġixxux (1).

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, lifiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-inqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha iktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hija r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hija li taħlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew iktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hija r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Kontroll ta' referenza: Kampjun mhux ittrattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi pproċessat mal-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi

▼M7

stabbilit ir-rispons baži għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv parallel, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-preċiżjoni (konkordanza ta' metodu ta' ttestjar) (21).

Affidabilità: Kejliet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbilità fl-istess u bejn il-laboratorarji u r-ripetibilità fl-istess laboratorju (21).

Riproduċibilità: Il-qbil bejn ir-riżultati miksub mill-ittestjar tal-istess sustanza kimika bl-użu tal-istess protokoll tat-test (ara affidabbiltà) (21).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (21).

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (21).

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha (1).

L-idoneità tas-sistema: L-istabbiliment tal-prestazzjoni tal-istrument (eż. is-sensittività) b'analiżi ta' standard ta' referenza qabel ma ssir l-analiżi tal-lott (22).

Sustanza kimika tat-test: It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża sabiex jirreferi għal dik li qiegħda tiġi ttestjata.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-ħaddiema tal-emerġenza) u l-ambjent (1).

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti b'reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi.

Metodu ta' ttestjar validu: Metodu ta' ttestjar meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabilità għal skop speċifiku u li huwa bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Metodu ta' ttestjar qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (21).

▼M7

Appendiċi 2

SUSTANZI TA' PROFIĊJENZA

Sensitizzazzjoni tal-Ġilda *In Chemico*: Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi

Qabel l-użu ta' rutina ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jiksbu b'mod korrett it-tbassir mistenni tad-DPRA għall-10 sustanzi ta' profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu valuri ta' tnaqqis taċ-ċisteina u l-liżina li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza għal kull peptid. Dawn is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Kriterji tal-għażla oħrajn kienu li jkunu disponibbli fis-suq, li hemm dejta ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja u dejta *in vitro* ta' kwalità għolja bid-DPRA għad-dispożizzjoni, u li ntużaw fl-istudju ta' validazzjoni koordinat mill-ECVAM tal-EURL sabiex tintwera l-implimentazzjoni b'suċċess tal-metodu ta' ttestjar fil-laboratorji li jieħdu sehem fl-istudju.

Tabella 1

Sustanzi ta' profiċjenza rrakkomandati sabiex tintwera l-profiċjenza teknika bl-Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi

Sustanzi ta' Profiċjenza	CASRN	stat fiżiku	Tbassir *In Vivo* [1]	Tbassir tad-DPRA [2]	Medda [3] ta' % tnaqqis tal-peptidi taċ-ċisteina	Medda [3] ta' % tnaqqis tal-peptidi tal-liżina
2,4-Dinitroklorobenżen	97-00-7	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	Pożittiv	90-100	15-45
Ossażolon	15646-46-5	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	Pożittiv	60-80	10-55
Formaldeid	50-00-0	Likwidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	Pożittiv	30-60	0-24
Benżiliden-aċeton	122-57-6	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	Pożittiv	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Likwidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	Pożittiv	15-55	0-25
2,3-Butanedjon	431-03-8	Likwidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	Pożittiv	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	0-7	0-5,5
6-Metilkumarin	92-48-8	Solidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	0-7	0-5,5
Aċidu Lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	0-7	0-5,5
4-Metossiaċetofenon	100-06-1	Solidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	0-7	0-5,5

([1]) It-tbassiriet tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* huma bbażati fuq dejta tal-LLNA (19). Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (23).
([2]) Tbassir tad-DPRA għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 11.
([3]) Meded stabbiliti fuq il-bażi ta' tal-inqas 10 valuri tat-tnaqqis iġġenerati minn 6 laboratorji indipendenti.

▼M7

Appendiċi 3

EŻEMPJI TA' SEKWENZA TAL-ANALIŻI

L-istandards tal-kalibraġġ u l-kontrolli ta' referenza	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Bafer ta' dilwizzjoni Kontroll ta' referenza A, rep 1 Kontroll ta' referenza A, rep 2 Kontroll ta' referenza A, rep 3
Kontrolli ta' koelwizzjoni	Kontroll ta' koelwizzjoni 1 għas-sustanza kimika tat-test 1 Kontroll ta' koelwizzjoni 2 għas-sustanza kimika tat-test 2
Kontrolli ta' referenza	Kontroll ta' referenza B, rep 1 Kontroll ta' referenza B, rep 2 Kontroll ta' referenza B, rep 3
L-ewwel sett ta' repliki	Kontroll ta' referenza C, rep 1 Aldeid ċinnamiku, rep 1 Kampjun 1, rep 1 Kampjun 2, rep 1
It-tieni sett ta' repliki	Kontroll ta' referenza C, rep 2 Aldeid ċinnamiku, rep 2 Kampjun 1, rep 2 Kampjun 2, rep 2
It-tielet sett ta' repliki	Kontroll ta' referenza C, rep 3 Aldeid ċinnamiku, rep 3 Kampjun 1, rep 3 Kampjun 2, rep 3
Kontrolli ta' referenza	Kontroll ta' referenza B, rep 4 Kontroll ta' referenza B, rep 5 Kontroll ta' referenza B, rep 6

Fis-sekwenza tal-analiżi għandhom ikunu inklużi tliet settijiet ta' kontrolli ta' referenza (jiġifieri kampjuni kostitwiti biss mill-peptid dissolt fis-solvent xieraq):
Kontroll ta' referenza A: użat sabiex tiġi vverifikata l-idoneità tas-sistema tal-HPLC.
Kontroll ta' referenza B: inkluż fil-bidu u fi tmiem is-sekwenza tal-analiżi sabiex tiġi verifikata l-istabilità tal-kontrolli ta' referenza tul il-ħin tal-analiżi.
Kontroll ta' referenza C: inkluż fis-sekwenza tal-analiżi sabiex jiġi verifikat li s-solvent użat sabiex tiġi dissolta s-sustanza kimika tat-test ma jħallix impatt fuq il-perċentwal ta' tnaqqis ta' peptidi.

▼M7

B.60. **SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-ARE-NRF2 LUCIFERASE**

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 442D tal-OECD (2015). Sensitizzatur tal-ġilda jirreferi għal sustanza li sejra twassal għal reazzjoni allerġika wara kuntatt mal-ġilda kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u r-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) ([1]). Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi proċedura *in vitro* (l-assaġġ tal-ARE-Nrf2 luciferase) li tintuża sabiex tappoġġja d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda skont il-GHS tan-NU (1) u s-CLP.

Hemm qbil ġenerali dwar l-avvenimenti bijoloġiċi ewlenin li jwasslu għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-għarfien eżistenti dwar il-mekkaniżmi kimiċi u bijoloġiċi assoċjati mas-sensitizzazzjoni tal-ġilda nġabar fil-forma ta' Passaġġ tal-Eżitu Avvers (AOP) (2), mill-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari permezz tal-avvenimenti intermedji għall-effett avvers fuq is-saħħa, jiġifieri dermatite b'kuntatt allerġiku fil-bniedem jew ipersensittività b'kuntatt f'rodituri (2) (3). L-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari huwa l-irbit kovalenti ta' sustanzi elettrofiliċi ma' ċentri nukleofiliċi fil-proteini tal-ġilda. It-tieni avveniment ewlieni f'dan l-AOP iseħħ fil-keratinoċiti u jinkludi risponsi infjammatorji kif ukoll l-espressjoni tal-ġeni assoċjata mal-passaġġi tas-sinjalar taċ-ċelloli speċifiċi bħall-passaġġi dipendenti fuq l-element ta' rispons tal-elettrofili/antiossidanti (ARE). It-tielet avveniment ewlieni huwa l-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi, tipikament ivvalutata bl-espressjoni ta' markaturi tal-wiċċ taċ-ċelloli, kemikini u ċitokini speċifiċi. Ir-raba' element ewlieni huwa l-proliferazzjoni taċ-ċellola-T, li tiġi vvalutata b'mod indirett fl-Assaġġ Lokali tal-Limfonodi murin (4).

Normalment, il-valutazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju. Il-metodi klassiċi bbażati fuq fniek tal-indi, it-Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek tal-Indi ta' Magnusson Kligman (GMPT) u t-Test Buehler (TM B.6 (5)), jistudjaw kemm il-fażi tal-induzzjoni kif ukoll il-fażi tal-eliċitazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. Test murin, l-Assaġġ Lokali tal-Limfonodi (LLNA, TM B.42 (4)) u ż-żewġ modifiki mhux radjuattivi tiegħu, LLNA: DA (TM B.50 (6)) u LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), li lkoll jivvalutaw ir-rispons tal-induzzjoni b'mod esklussiv, ġew aċċettati wkoll peress li jagħtu vantaġġi fuq it-testijiet fuq il-ħnieżer tal-indi kemm f'termini tat-trattament xieraq tal-annimali kif ukoll tal-kejl oġġettiv tal-fażi tal-induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Iktar riċentement, metodi ta' ttestjar *in chemico* u *in vitro* bbażati mekkanistikament tqiesu xjentifikament validi għall-evalwazzjoni tal-periklu ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet ta' metodi mhux tal-annimali (*in silico, in chemico, in vitro*) fi ħdan Approċċi Integrati għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni (IATA) sejrin ikunu meħtieġa sabiex ikunu sostitwiti bis-sħiħ it-testijiet fuq l-annimali li jintużaw bħalissa fid-dawl tal-kopertura mekkanistika ristretta tal-AOP ta' kull wieħed mill-metodi ta' ttestjar mhux fuq l-annimali li għandna għad-dispożizzjoni bħalissa (2) (3).

Dan il-metodu ta' ttestjar (assaġġ tal-ARE-Nrf2 luciferase) huwa propost sabiex jiġi indirizzat it-tieni avveniment ewlieni kif spjegat fil-paragrafu 2. Is-sensitizzaturi tal-ġilda ġew irrapportati li jinduċu ġeni li huma rregolati mill-element ta' rispons tal-antiossidanti (ARE) (8) (9). Sustanzi elettrofiliċi żgħar bħal sensitizzaturi tal-ġilda jistgħu jaġixxu fuq il-proteina sensur Keap1 (proteina 1 assoċjata

([1]) Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1

▼M7

mal-ECH bħall-Kelch), b'pereżempju modifika kovalenti tar-residwu taċ-ċisteina tagħha, li tirriżulta fid-dissoċjazzjoni tagħha mill-fattur ta' traskrizzjoni Nrf2 (fattur 2 relatat mal-eritrojde 2 tal-fattur nukleari). Imbagħad l-Nrf2 dissoċjat jista' jattiva ġeni dipendenti fuq l-ARE bħal dawk li jikkodifikaw għal enzimi detossifikanti tal-fażi II (8) (10) (11).

Bħalissa, l-uniku assaġġ *in vitro* ARE-Nrf2 luciferase kopert minn dan il-metodu ta' ttestjar huwa l-assaġġ KeratinoSens™ li għalih saru studji ta' validazzjoni (9) (12) (13) segwiti minn reviżjoni bejn il-pari indipendenti li ssir mil-Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Annimali (EURL ECVAM) (14). L-assaġġ KeratinoSens™ tqies li huwa xjentifikament validu sabiex jintuża bħala parti minn IATA għall-appoġġ tad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda għall-fini ta' klassifikazzjoni u tikkettar tal-periklu (14). Il-laboratorji li lesti li jimplimentaw il-metodu ta' ttestjar jistgħu jiksbu l-linja ta' ċelloli rikombinanti użata fl-assaġġ KeratinoSens™ billi jistabbilixxu qbil fuq il-liċenzji mal-iżviluppatur tal-metodu ta' ttestjar (15).

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI, APPLIKABILITÀ U LIMITAZZJONIJIET

Peress li l-attivazzjoni tal-passaġġ tal-Keap1-Nrf2-ARE tindirizza biss it-tieni avveniment ewlieni tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, l-informazzjoni mill-metodi ta' ttestjar fuq il-bażi tal-attivazzjoni ta' dan il-passaġġ aktarx li ma tkunx biżżejjed meta tintuża waħedha sabiex tinħareġ konklużjoni fuq il-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Għaldaqstant, dejta ġġenerata b'dan il-metodu ta' ttestjar għandha tiġi kkunsidrata fil-kuntest ta' approċċi integrati bħall-IATA, biex b'hekk tiġi kombinata ma' informazzjoni komplimentari oħra, eż. derivata minn assaġġi *in vitro* li jindirizzaw avvenimenti ewlenin oħrajn tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kif ukoll metodi mhux ta' ttestjar inklużi read-across minn analogi kimiċi. Eżempji dwar kif jintuża l-metodu ta' ttestjar ARE-Nrf2 luciferase flimkien ma' informazzjoni oħra huma rrapportati fit-tagħrif (13) (16) (17) (18) (19).

Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża sabiex jappoġġja d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/CLP) u mhux sensitizzaturi fil-kuntest tal-IATA. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jintuża waħdu, lanqas sabiex jiġu sottokategorizzati sensitizzaturi tal-ġilda f'sottokategoriji 1A u 1B kif definiti mill-GHS/CLP tan-NU, u lanqas sabiex titbassar il-potenza għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjoni tas-sikurezza. Madankollu, skont il-qafas regolatorju, riżultat pożittiv jista' jintuża waħdu sabiex sustanza kimika tiġi klassifikata fil-kategorija 1 tal-GHS/CLP tan-NU.

Fuq il-bażi tas-sett ta' dejta mill-istudju ta' validazzjoni u l-ittestjar li jsir internament għar-reviżjoni bejn il-pari indipendenti tal-metodu ta' ttestjar, l-assaġġ KeratinoSens™ wera li huwa trasferibbli għal laboratorji esperjenzati fil-kultura taċ-ċelloli. Il-livell ta' riproduċibbilità fil-previżjonijiet li jistgħu jkunu mistennijin mill-metodu ta' ttestjar huwa fl-ordni ta' 85 % fi ħdan il-laboratorji u bejn il-laboratorji (14). Il-preċiżjoni (77 % — 155/201), is-sensittività (78 % — 71/91) u l-ispeċifiċità (76 % — 84/110) tal-assaġġ KeratinoSens™ għad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/CLP) u mhux sensitizzaturi meta mqabblin mar-riżultati tal-LLNA ġew ikkalkolati billi ġiet ikkunsidrata d-dejta kollha li ġiet sottomessa lill-EURL ECVAM għall-evalwazzjoni u reviżjoni bejn il-pari tal-metodu ta' ttestjar (14). Dawn il-figuri huma simili għal dawk li dan l-aħħar ġew ippubblikati dwar l-ittestjar li sar internament ta'

▼M7

madwar 145 sustanza (77 % preċiżjoni, 79 % sensittività, 72 % speċifiċità) (13). L-assaġġ KeratinoSens™ għandu probabilità ikbar li jbassar sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri sottokategorija 1B tas-CLP/GHS tan-NU) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri sottokategorija 1A tas-CLP/GHS tan-NU) (13) (14). Meħuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tal-assaġġ KeratinoSens™ sabiex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Madankollu, il-valuri tal-preċiżjoni mogħtijin hawnhekk għall-assaġġ KeratinoSens™ bħala metodu ta' ttestjar waħdu huma indikattivi biss peress li l-metodu ta' ttestjar għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħrajn ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafu 9 ta' hawn fuq. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li l-LLNA kif ukoll testijiet oħrajn fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fl-ispeċi ta' interess, jiġifieri fil-bniedem.

It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar sabiex jirreferi għal dak li jkun qiegħed jiġi ttestjat u mhux b'rabta mal-applikabilità tal-metodu ta' ttestjar tal-ARE-Nrf2 luciferase għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew taħlitiet. Fuq il-bażi tad-dejta attwali disponibbli, intwera li l-assaġġ KeratinoSens™ huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, mekkaniżmi ta' reazzjoni, potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u proprjetajiet fiżikokimiċi (9) (12) (13) (14). Fil-parti l-kbira ġew ittestjati sustanzi monokostitwenti, għad li jeżisti wkoll ammont limitat ta' dejta fuq l-ittestjar ta' taħlitiet (20). Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda huwa teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti u taħlitiet. Madankollu, qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Barra minn hekk, meta jiġu ttestjati sustanzi multikostitwenti jew taħlitiet, għandha tingħata kunsiderazzjoni lill-interferenza possibbli tal-kostitwenti ċitotissiċi bir-risponsi osservati. Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test solubbli jew li jifformaw dispersjoni stabbli (jiġifieri kollojde jew sospensjoni li fiha s-sustanza kimika tat-test ma tissedimentax jew tissepara mis-solvent f'fażijiet differenti) jew fl-ilma jew f'DMSO (inklużi l-komponenti kollha tas-sustanza kimika tat-test fil-każ ta' ttestjar ta' sustanza multikostitwenti jew taħlita). Is-sustanzi kimiċi li ma jissodisfawx dawn il-kundizzjonijiet fl-ogħla konċentrazzjoni finali meħtieġa ta' 2 000 μM (ara l-paragrafu 22) xorta waħda jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjoni inqas. F'dan il-każ, ir-riżultati li jissodisfaw il-kriterji għall-pożittività deskritti fil-paragrafu 39 xorta waħda jistgħu jintużaw sabiex isostnu l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala sensitizzatur tal-ġilda, filwaqt li riżultat negattiv iksub b'konċentrazzjonijiet < 1 000 μM għandu jitqies bħala inkonklużiv (ara l-mudell ta' tbassir fil-paragrafu 39). F'sustanzi ġenerali b'LogP sa 5 li ġew ittestjati b'suċċess filwaqt li sustanzi ferm idrofobiċi b'LogP ta' iktar minn 7 jiġu barra l-applikabilità magħrufa tal-metodu ta' ttestjar (14). Għal sustanzi b'LogP bejn 5 u 7, hemm biss informazzjoni limitata.

Riżultati negattivi għandhom jiġu interpretati bil-galbu peress li sustanzi b'reattività esklussiva għal residwi tal-liżina jistgħu jiġu individwati bħala negattivi mill-metodu ta' ttestjar. Barra minn hekk, minħabba l-kapaċità metabolika limitata tal-linja ta' ċelloli użata (21) u minħabba l-kundizzjonijiet tal-esperiment, proapteni (jiġifieri sustanzi kimiċi li jeħtieġu attivazzjoni enzimatika, pereżempju enzimi P450) u preapteni (jiġifieri sustanzi kimiċi attivati b'awtoossidazzjoni) b'mod partikolari b'rata ta' ossidazzjoni baxxa jistgħu jipprovdu riżultati negattivi wkoll. Min-naħa l-oħra, sustanzi kimiċi tat-test li ma jaġixxux bħala sensitizzatur iżda xorta waħda jkunu stressers kimiċi jistgħu jwasslu għal riżultati foloz pożittivi (14). Barra minn hekk, sustanzi kimiċi tat-test ferm ċitotossiċi jejjem jistgħu jiġu vvalutati b'mod affidabbli. Finalment, sustanzi kimiċi tat-test li jinterferixxu mal-enzima luċiferaži jistgħu jħawdu l-attività ta' luċiferaži f'assaġġi bbażati fuq iċ-ċelloli li jikkawżaw inibizzjoni apparenti jew luminexxenza ikbar (22). Pereżempju, konċentrazzjonijiet ta' fitoestroġen ikbar minn 1 μM ġew irrapportati li jinterferixxu mas-sinjali ta' luminexxenza f'assaġġi oħrajn tal-ġene indikatur ibbażati fuq luċiferaži minħabba sovrattivazzjoni tal-ġene indikatur ta' luċiferaži (23).

▼M7

Bħala konsegwenza, l-espressjoni ta' luċiferaži miksuba f'konċentrazzjonijiet għoljin ta' fitoestroġeni jew sustanzi kimiċi simili ssuspettati li jipproduċu sovrattivazzjoni bħall-fitoestroġen tal-ġene indikatur ta' luċiferaži jridu jiġu eżaminati bir-reqqa (23). F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabilità tal-metodu ta' ttestjar għal kategoriji speċifiċi ta' sustanzi kimiċi tat-test, il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

Minbarra li jgħin fid-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi, l-assaġġ KeratinoSens™ jipprovdi wkoll informazzjoni dwar ir-rispons għall-konċentrazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA (19). Madankollu, hemm bżonn li jsir iktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' dejta affidabbli mill-bniedem, sabiex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tal-assaġġ KeratinoSens™ jistgħu jikkontribwixxu għall-valutazzjoni tal-potenza (24) u għas-sottokategorizzazzjoni tas-sensitizzaturi skont il-GHS tan-NU/CLP.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-metodu ta' ttestjar tal-ARE-Nrf2 luciferase jagħmel użu minn linja ta' ċelloli aderenti immortalizzata miksuba minn keratinoċiti umani HaCaT transfessi b'mod stabbli bi plażmid selezzjonabbli. Il-linja ta' ċelloli li fiha l-ġene luċiferaži taħt il-kontroll transkrizzjonali ta' promotur kostitwittiv fuż ma' element ARE minn ġene li huwa magħruf li jiġi sopraregolat minn sensitizzaturi ta' kuntatt (25) (26). Is-sinjal ta' luċiferaži jirrifletti l-attivazzjoni minn sensitizzaturi ta' ġeni dipendenti Nrf2 endoġeni, u ntweriet id-dipendenza tas-sinjal ta' luċiferaži fil-linja ta' ċelloli rikombinanti fuq Nrf2 (27). Dan jippermetti li jsir kejl kwantitattiv (b'detezzjoni tal-luminexxenza) tal-induzzjoni tal-ġene ta' luċiferaži, bl-użu ta' sottostrati ta' luċiferaži li jipproduċu d-dawl ferm stabbiliti, bħala indikatur tal-attività tal-fattur ta' traskrizzjoni ta' Nrf2 f'ċelloli wara l-esponiment għal sustanzi elettrofiliċi.

Is-sustanzi kimiċi tat-test jitqiesu pożittivi fl-assaġġ KeratinoSens™ jekk jinduċu induzzjoni statistikament sinifikanti tal-attività ta' luċiferaži f'livell ogħla minn limitu partikolari (jiġifieri > żieda b'darba u nofs jew 50 %), taħt konċentrazzjoni definita li ma taffettwax b'mod sinifikanti l-vijabbiltà (jiġifieri inqas minn 1 000 μM u f'konċentrazzjoni li fiha l-vijabbiltà ċellolari tkun ogħla minn 70 % (9) (12)). Għal dan il-għan, tiġi stabbilita l-induzzjoni tad-drabi massimali tal-attività ta' luċiferaži fuq il-kontroll tas-solvent (negattiv) (I_{max}). Barra minn hekk, peress li ċ-ċelloli huma esposti għal sensiela ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test, il-konċentrazzjoni meħtieġa għal induzzjoni statistikament sinifikanti ta' attività ta' luċiferaži ogħla mil-limitu (jiġifieri valur tal-$EC_{1.5}$) għandha tiġi interpolata mill-kurva ta' doża — rispons (ara l-paragrafu 32 għall-kalkoli). Finalment, għandhom isiru kejliet taċ-ċitotossiċità paralleli sabiex jiġi vvalutat jekk il-livelli ta' induzzjoni tal-attività ta' luċiferaži jseħħux f'konċentrazzjonijiet sottoċitotossiċi.

Qabel l-użu ta' rutina tal-assaġġ tal-ARE-Nrf2 luciferase li jaderixxi għal dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-għaxar Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 2.

Standards tal-prestazzjoni (PS) (28) huma disponibbli sabiex tiġi ffaċilitata l-validazzjoni ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* tal-ARE-Nrf2 luciferase simili għall-assaġġ KeratinoSens™ u jippermettu għall-emendar fil-ħin ta' dan il-metodi ta' ttestjar għall-inklużjoni tagħhom. Aċċettazzjoni Reċiproka tad-Dejta (MAD) skont il-ftehim tal-OECD sejjer ikun garantit biss għal metodi ta' ttestjar ivvalidati skont il-PS, jekk dawn il-metodi ta' ttestjar ġew riveduti u inklużi fil-linja gwida ta' ttestjar korrispondenti mill-OECD.

▼M7

PROĊEDURA

Bħalissa, l-uniku metodu kopert minn dan il-metodu ta' ttestjar huwa l-assaġġ xjentifikament validu KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Il-Proċeduri Operazzjonali Standard (SOP) għall-assaġġ KeratinoSens™ huma disponibbli u għandhom jitħaddmu meta jiġi implimentat u jintuża l-metodu ta' ttestjar fil-laboratorju (15). Il-laboratorji li lesti li jimplimentaw il-metodu ta' ttestjar jistgħu jiksbu l-linja ta' ċelloli rikombinanti użata fl-assaġġ KeratinoSens™ billi jistabbilixxu qbil fuq il-liċenzji mal-iżviluppatur tal-metodu ta' ttestjar (15). Il-paragrafi li ġejjin jipprovdu deskrizzjoni tal-komponenti u l-proċeduri ewlenin ta' ttestjar tal-metodu ta' ttestjar tal-ARE-Nrf2 luciferase.

Preparazzjoni tal-kulturi tal-keratinoċiti

Għandha tintuża linja ta' ċelloli transġenika b'inserzjoni stabbli tal-ġene indikatur ta' luċiferaži taħt il-kontroll tal-element ARE (eż. linja ta' ċelloli tal-KeratinoSens™). Malli jiġu riċevuti, iċ-ċelloli jiġu propagati (eż. 2 sa 4 passiġġieri) u jinħażnu ffriżati bħala stokk omoġenu. Ċelloli minn dan l-istokk oriġinali jistgħu jiġu propagati sa numru massimu ta' passiġġieri (jiġifieri 25 fil-każ ta' KeratinoSens™) u jitħaddmu għall-ittestjar ta' rutina bl-użu tal-medium ta' manutenzjoni xieraq (fil-każ ta' KeratinoSens™ dan jirrappreżenta DMEM b'serum u Ġeneticina).

Għall-ittestjar, iċ-ċelloli għandhom ikunu 80-90 % konfluwenti, u wieħed għandu joqgħod attent li jiżgura li ċ-ċelloli qatt ma jikbru għal konfluwenza sħiħa. Jum wieħed qabel ma jiġu ttestjati, iċ-ċelloli jinġabru u jiġu distribwiti fi pjastri b'96 bwejra (10 000 ċellola/bwejra fil-każ ta' KeratinoSens™). Għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata sedimenazzjoni taċ-ċelloli matul it-tiżrigħ sabiex tiġi żgurata distribuzzoni ta' numru omoġenu ta' ċelloli bejn il-bwejriet. Jekk dan mhuwiex il-każ, dan l-istadju jista' jwassal għal varjabbiltà kbira bejn bwejra u oħra. Għal kull ripetizzjoni, jintużaw tliet repliki għall-kejliet tal-attività ta' luċiferaži, u replika parallela waħda użata għall-assaġġ tal-vijabbiltà taċ-ċelloli.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

Is-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jitħejjew dakinhar tal-ittestjar. Għall-assaġġ KeratinoSens™, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti fis-sulfossidu tad-dimetil (DMSO) għall-konċentrazzjoni finali mixtieqa (eż. 200 mM). Is-soluzzjonijiet tad-DMSO jistgħu jitqiesu awtosterelizzanti, u b'hekk ma hemm bżonn ta' ebda filtrazzjoni sterili. Is-sustanza kimika tat-test mhux solubbli fid-DMSO tiġi dissolta f'ilma sterili jew medium tal-kultura sterili, u s-soluzzjonijiet sterelizzati b'pereżempju filtrazzjoni. Għal sustanza kimika tat-test li ma għandha ebda piż molekolari definit (MW), titħejja soluzzjoni ewlenija għal konċentrazzjoni prestabbilita (40 mg/mL jew 4 % (w/v)) fl-assaġġ KeratinoSens™. F'każ li jintużaw solventi oħrajn li mhumiex DMSO, ilma jew il-medium tal-kultura, għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika suffiċjenti.

Fuq il-bażi tas-soluzzjonijiet ewlenin DMSO tas-sustanza kimika tat-test, isiru dilwizzjonijiet serjali bl-użu tad-DMSO sabiex jinkisbu 12-il konċentrazzjoni ewlenija tas-sustanza kimika li sejra tiġi ttestjata (minn 0.098 sa 200 mM fl-assaġġ KeratinoSens™ assay). Għal sustanza kimika tat-test mhux solubbli fid-DMSO, id-dilwizzjonijiet sabiex jinkisbu l-konċentrazzjonijiet ewlenin isiru bl-użu ta' ilma sterili jew medium tal-kultura sterili. Indipendentement mis-solvent użat, il-konċentrazzjonijiet ewlenin, imbagħad jiġu dilwiti għal 25 darba fil-medium tal-kultura li fih is-serum, u finalment jintużaw għat-trattament b'fattur ta' dilwizzjoni 4 darbiet oħra sabiex il-konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika ttestjata jvarjaw minn 0.98 sa 2 000 μM fl-assaġġ KeratinoSens™. Jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet oħrajn jekk tiġi pprovduta ġustifikazzjoni (eż. fil-każ ta' ċitotossiċità jew solubilità baxxa).

Il-kontroll negattiv (solvent) użat fl-assaġġ KeratinoSens™ huwa DMSO (Nru CAS 67-68-5, ≥ purità ta' 99 %), li għalih jitħejjew sitt bwejriet għal kull pjastra. Jgħaddi mill-istess dilwizzjoni kif deskritta għall-konċentrazzjonijiet ewlenin fil-paragrafu 22, sabiex il-konċentrazzjoni tal-kontroll negattiv (solvent) finali tkun

▼M7

1 %, magħrufa li ma taffettwax il-vijabbiltà taċ-ċelloli u tikkorrispondi għall-istess konċentrazzjoni tad-DMSO li tinstab fis-sustanza kimika ttestjata u fil-kontroll pożittiv. Għal sustanza kimika tat-test mhux solubbli fid-DMSO, li għaliha d-dilwizzjonijiet saru fl-ilma, il-livell tad-DMSO fil-bwejriet kollha tas-soluzzjoni finali tat-test irid jiġi aġġustat għal 1 % bħal għas-sustanzi kimiċi tat-test u s-sustanzi tal-kontroll l-oħrajn.

Il-kontroll pożittiv użat fl-assaġġ KeratinoSens™ huwa aldeid ċinnamiku (Nru CAS 14371-10-9, ≥ purità ta' 98 %), li għalih titħejja sensiela ta' 5 konċentrazzjoni ewlenin li jvarjaw minn 0.4 sa 6.4 mM fid-DMSO (minn soluzzjoni ewlenija ta' 6.4 mM) u dilwiti kif deskritt għall-konċentrazzjonijiet ewlenin fil-paragrafu 22, sabiex il-konċentrazzjoni finali tal-kontroll pożittiv tvarja minn 4 sa 64 µM. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħrajn, idealment li jipprovdu valuri fil-medda medja tal-$EC_{1.5}$, jekk ikun hemm dejta storika disponibbli sabiex jinkisbu kriterji ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni paragunabbli.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

Għal kull sustanza kimika tat-test u sustanza tal-kontroll pożittiv, huwa meħtieġ esperiment wieħed sabiex jinkiseb tbassir (pożittiv jew negattiv), li jikkonsisti f'tal-inqas żewġ ripetizzjonijiet indipendenti li kull wieħed ikun fih tliet repliki (jiġifieri n=6). Fil-każ ta' riżultati li ma jaqblux bejn iż-żewġ ripetizzjonijiet indipendenti, għandha ssir it-tielet ripetizzjoni li fiha tliet repliki (jiġifieri n=9). Kull ripetizzjoni indipendenti ssir f'ġurnata differenti b'soluzzjoni ewlenija ġdida tas-sustanzi kimiċi tat-test u ċelloli miġburin indipendentement. Madankollu, iċ-ċelloli jistgħu jkunu ġejjin mill-istess passaġġ.

Wara t-tiżrigħ deskritt fil-paragrafu 20, iċ-ċelloli jitkabbru għal 24 siegħa fil-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra. Imbagħad il-medium jitneħħa u jiġi sostitwit ma' medium tal-kultura ġdid (medium tal-kultura ta' 150 µl li fih serum iżda mingħajr Ġenetiċina fil-każ ta' KeratinoSens™) li miegħu jiżdiedu 50 µl tas-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll dilwiti 25 darba. Tal-inqas bwejra waħda għal kull pjastra għandha titħalla vojta (ebda ċellola u ebda trattament) sabiex jiġu vvalutati l-valuri ta' sfond.

Il-pjastri ttrattati mbagħad jiġu inkubati għal madwar 48 siegħa f'37 ± 1 °C fil-preżenza ta' 5 % CO_2 fl-assaġġ KeratinoSens™. Għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata l-evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni inkroċjata bejn bwejriet minn sustanzi kimiċi tat-test, eż. billi l-pjastri jitgħattew bil-fojl qabel l-inkubazzjoni bis-sustanzi kimiċi tat-test.

Kejliet tal-attività ta' luċiferaži

Tliet fatturi huma kritiċi sabiex jiġi żgurat qari tajjeb tal-valuri tal-luminexxenza:

— l-għażla ta' luminometru sensittiv,

— l-użu ta' format ta' pjastra għolja biżżejjed sabiex tevita kontaminazzjoni kroċjata ħafifa; u

— l-użu ta' sottostrat ta' luċiferaži b'biżżejjed output ta' dawl sabiex jiġu żgurati sensittività suffiċjenti u varjabbiltà baxxa.

Qabel l-ittestjar, għandu jsir issettjar tal-esperiment tal-kontroll kif deskritt fl-Appendiċi 3 sabiex jiġ żgurat li jkunu ssodisfati dawn it-tliet punti.

Wara l-ħin tal-esponiment ta' 48 siegħa bis-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll fl-assaġġ KeratinoSens™, iċ-ċelloli jinħaslu b'salina bbaferjata bil-fosfat, u l-bafer tal-liżi rilevanti għall-qari tal-valuri tal-luminexxenza jiżdied f'kull bwejra għal 20 min f'temperatura ambjentali.

▼M7

Il-pjastri bil-liżat taċ-ċelloli mbagħad jitqiegħdu fil-luminometri għall-qari ta' liema fl-assaġġ KeratinoSens™ hija programmata sabiex: (i) iżżid is-sottostrat ta' luċiferaži f'kull bwejra (jiġifieri 50 µl), (ii) tistenna sekonda, u (iii) tintegra l-attività ta' luċiferaži għal 2 sekondi. F'każ li jintuża ssettjar differenti, eż. skont il-mudell tal-luminometru użat, dan għandu jkun iġġustifikat. Barra minn hekk, jista' jintuża wkoll sottostrat li jiddi diment li jkun ta' suċċess l-esperiment tal-kontroll tal-kwalità tal-Appendiċi 3.

Valutazzjoni taċ-Ċitotossiċità

Għall-assaġġ tal-vijabbiltà taċ-ċelloli KeratinoSens™, il-medium jiġi sostitwit wara l-ħin tal-esponiment ta' 48 siegħa b'medium ġdid li fih MTT (3-(4,5-Dimetiltjażol-2-yl)-2,5-difeniltetrażolju bromur, Tjażolil blu tetrażolju bromur; Nru CAS 298-93-1) u ċ-ċelloli inkubati għal 4 sigħat f'37 °C fil-preżenza ta' 5 % CO_2. Imbagħad jitneħħa l-medium tal-MTT u ċ-ċelloli jiġu lizzati (eż. billi tiżdied soluzzjoni SDS ta' 10 % f'kull bwejra) mal-lejl. Wara t-tħawwid, jitkejjel l-assorbiment f'600 nm b'fotometru.

DEJTA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-Dejta

Il-parametri li ġejjin huma kkalkolati fl-assaġġ KeratinoSens™:

— l-induzzjoni medja massimali tad-drabi tal-valur ta' attività ta' luċiferaži (I_{max}) osservat fi kwalunkwe konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u l-kontroll pożittiv;

— inkiseb il-valur tal-$EC_{1.5}$ li jirrappreżenta l-konċentrazzjoni li għaliha l-induzzjoni tal-attività ta' luċiferaži tkun ogħla mil-limitu ta' darba u nofs (jiġifieri attività ta' luċiferaži msaħħa ta' 50 %); u

— il-valuri tal-konċentrazzjoni tal-IC_{50} u IC_{30} għal tnaqqis ta' 50 % u 30 % tal-vijabbiltà ċellolari.

— L-induzzjoni tad-drabi tal-attività ta' luċiferaži tiġi kkalkolata bl-Ekwazzjoni 1, u l-induzzjoni tad-drabi massimali kumplessiva (I_{max}) tiġi kkalkolata bħala l-medja tar-ripetizzjonijiet individwali.

Ekwazzjoni 1:

$$Fold\ induction = \frac{(L_{sample} - L_{blank})}{(L_{solvent} - L_{blank})}$$

fejn

$L_{kampjun}$ hija l-valur ta' luminexxenza fil-bwejra tas-sustanza kimika tat-test

$L_{inbjank}$ hija l-valur ta' luminexxenza fil-bwejra inbjank li ma fiha ebda ċellola u ebda trattament

$L_{solvent}$ hija l-valur medju tal-luminexxenza fil-bwejriet li fihom ċelloli u kontroll tas-solvent (negattiv)

$EC_{1.5}$ tiġi kkalkolata bl-interpolazzjoni lineari skont l-Ekwazzjoni 2, u l-$EC_{1.5}$ kumplessiva tiġi kkalkolata bħala l-medja ġeometrika tar-ripetizzjonijiet individwali.

Ekwazzjoni 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

fejn

C_a hija l-inqas konċentrazzjoni f'μM b'induzzjoni ta' > darba u nofs

C_b hija l-ogħla konċentrazzjoni f'μM b'induzzjoni ta' < darba u nofs

I_a hija l-induzzjoni tad-drabi mkejla fl-inqas konċentrazzjoni b'induzzjoni ta' > darba u nofs (medja ta' tliet bwejriet ta' replika)

I_b hija l-induzzjoni tad-drabi mkejla fl-ogħla konċentrazzjoni b'induzzjoni ta' < darba u nofs (medja ta' tliet bwejriet ta' replika)

Il-vijabbiltà hija kkalkolata bl-Ekwazzjoni 3:

Ekwazzjoni 3:

$$Viability = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

fejn

$V_{kampjun}$ hija l-valur tal-assorbiment tal-MTT fil-bwejra tas-sustanza kimika tat-test

$V_{inbjank}$ hija l-valur tal-assorbiment tal-MTT fil-bwejra inbjank li ma fiha ebda ċellola u ebda trattament

$V_{solvent}$ hija l-valur medju l-valur tal-assorbiment tal-MTT fil-bwejriet li fihom ċelloli u kontroll tas-solvent (negattiv)

IC_{50} u IC_{30} jiġu kkalkolati bl-interpolazzjoni lineari skont l-Ekwazzjoni 4, u l-IC_{50} u IC_{30} kumplessivi jiġu kkalkolati bħala l-medja ġeometrika tar-ripetizzjonijiet individwali.

Ekwazzjoni 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

fejn

X huwa t-tnaqqis % fil-konċentrazzjoni li jrid jiġi kkalkolat (50 u 30 għal IC_{50} u IC_{30})

C_a hija l-inqas konċentrazzjoni f'μM bi tnaqqis ta' > x % fil-vijabbiltà

C_b hija l-ogħla konċentrazzjoni f'μM bi tnaqqis ta' < x % fil-vijabbiltà

V_a hija l-vijabbiltà % fl-inqas konċentrazzjoni bi tnaqqis ta' > x % fil-vijabbiltà

V_b hija l-vijabbiltà % fl-ogħla konċentrazzjoni bi tnaqqis ta' < x % fil-vijabbiltà

Għal kull konċentrazzjoni li turi induzzjoni tal-attività ta' luċiferaża ta' > darba u nofs, tiġi kkalkolata s-sinifikanza statistika (eż. b'test-t ta' Student b'żewġt idnieb), billi jitqabblu l-valuri tal-luminexxenza għat-tliet kampjuni repliki mal-valuri tal-luminexxenza fil-bwejriet tal-kontroll tas-solvent (negattiv) sabiex jiġi stabbilit jekk l-induzzjoni tal-attività ta' luċiferaża hijiex statistikament sinifikanti ($p < 0.05$). L-inqas konċentrazzjoni b'induzzjoni tal-attività ta' luċiferaża ta' > darba u nofs hija l-valur li jistabbilixxi l-valur tal-$EC_{1.5}$. Huwa vverifikat f'kull każ jekk dan il-valur huwiex inqas mill-valur tal-IC_{30}, xi ħaġa li tindika li hemm inqas minn tnaqqis ta' 30 % fil-vijabbiltà ċellolari fil-konċentrazzjoni li tiddetermina l-$EC_{1.5}$.

▼M7

Huwa rakkomandat li d-dejta tiġi vverifikata b'mod viżwali bl-għajnuna ta' graffijiet. Jekk ma tiġi osservata ebda kurva ċara ta' doża — rispons, jew jekk il-kurva ta' doża — rispons miksuba tkun bifażika (jiġifieri taqbeż il-limitu ta' 1.5 darbtejn), l-esperiment għandu jerġa' jsir sabiex jiġi verifikat jekk din hijiex speċifika għas-sustanza kimika tat-test jew hijiex dovuta għal artefatt tal-esperiment. F'każ li r-rispons bifażiku jkun riproduċibbli f'esperiment indipendenti, għandu jiġi rrapportat il-valur inferjuri tal-$EC_{1.5}$ (il-konċentrazzjoni meta l-limitu ta' 1.5 jinqabeż għall-ewwel darba).

Fil-każijiet rari li fihom tiġi osservata induzzjoni mhux statistikament sinifikanti ogħla minn darba u nofs segwita minn konċentrazzjoni ogħla b'induzzjoni statistikament sinifikanti, ir-riżultati minn din ir-ripetizzjoni jitqiesu bħala validi u pożittivi biss jekk l-induzzjoni statistikament sinifikanti ogħla mil-limitu ta' 1.5 inkisbet għal konċentrazzjoni mhux ċitotossika.

Finalment, għal sustanzi tat-test li jiġġeneraw induzzjoni ta' darba u nofs jew ikbar diġà fl-inqas konċentrazzjoni tat-test ta' 0.98 μM, jiġi stabbilit il-valur tal-$EC_{1.5}$ ta' <0.98 fuq il-bażi ta' spezzjoni viżwali tal-kurva ta' doża — rispons.

Kriterji ta' aċċettazzjoni

Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża l-assaġġ KeratinoSens™. L-ewwel nett, l-induzzjoni tal-attività ta' luċiferaži miksuba bil-kontroll pożittiv, l-aldeid ċinnamiku, għandha tkun statistikament sinifikanti ogħla mil-livell ta' 1.5 (eż. bl-użu ta' test-T) f'tal-inqas waħda mill-konċentrazzjonijiet ittestjati (minn 4 sa 64 μM).

It-tieni, il-valur tal-$EC_{1.5}$ għandu jkun fi ħdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika tal-faċilità ta' ttestar (eż. bejn 7 μM u 30 μM fuq il-bażi tas-sett ta' dejta ta' validazzjoni) li għandha tiġi aġġornata b'mod regolari. Barra minn hekk, l-induzzjoni medja fit-tliet repliki għall-aldeid ċinnamiku f'64 μM għandha tkun ta' bejn 2 u 8. Jekk ma jkunx issodisfat dan l-aħħar kriterju, ir-rispons għad-doża tal-aldeid ċinnamiku għandu jiġi vverifikat bil-galbu, u t-testijiet jisgħu jiġu aċċettati biss jekk ikun hemm rispons għad-doża ċar b'induzzjoni tal-attività ta' luċiferaži li tiżdied meta jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet għall-kontroll pożittiv.

Fl-aħħar nett, il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni tal-qari tal-valur tal-luminexxenza għad-DMSO tal-kontroll negattiv (solvent) għandu jkun inqas minn 20 % f'kull ripetizzjoni li tikkonsisti f'6 bwejriet ittestjati fi triplikat. Jekk il-varjabbiltà tkun ogħla, ir-riżultati għandhom jiġu injorati.

Interpretazzjoni tar-riżultati u l-mudell ta' tbassir

Tbassir ta' KeratinoSens™ jitqies pożittiv jekk ikunu ssodisfati l-4 kundizzjonijiet li ġejjin fi 2 minn 2 jew fl-istess 2 minn 3 ripetizzjonijiet, inkella t-tbassir ta' KeratinoSens™ jitqies negattiv (Figura 1):

1. I_{max} hija ogħla (>) minn darba u nofs u statistikament differenti b'mod sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll tas-solvent (negattiv) (kif stabbilit mit-test-T Student diżakkoppjat b'żewġt idnieb);

2. il-vijabbiltà ċellolari hija ogħla minn (>) 70 % fl-inqas konċentrazzjoni bl-induzzjoni ta' attività ta' luċiferaži ikbar minn darba u nofs (jiġifieri fil-konċentrazzjoni li tiddetermina l-$EC_{1.5}$);

3. il-valur tal-$EC_{1.5}$ huwa inqas minn (<) 1 000 μM (jew < 200 μg/ml għal sustanzi kimiċi tat-test mingħajr MW definit);

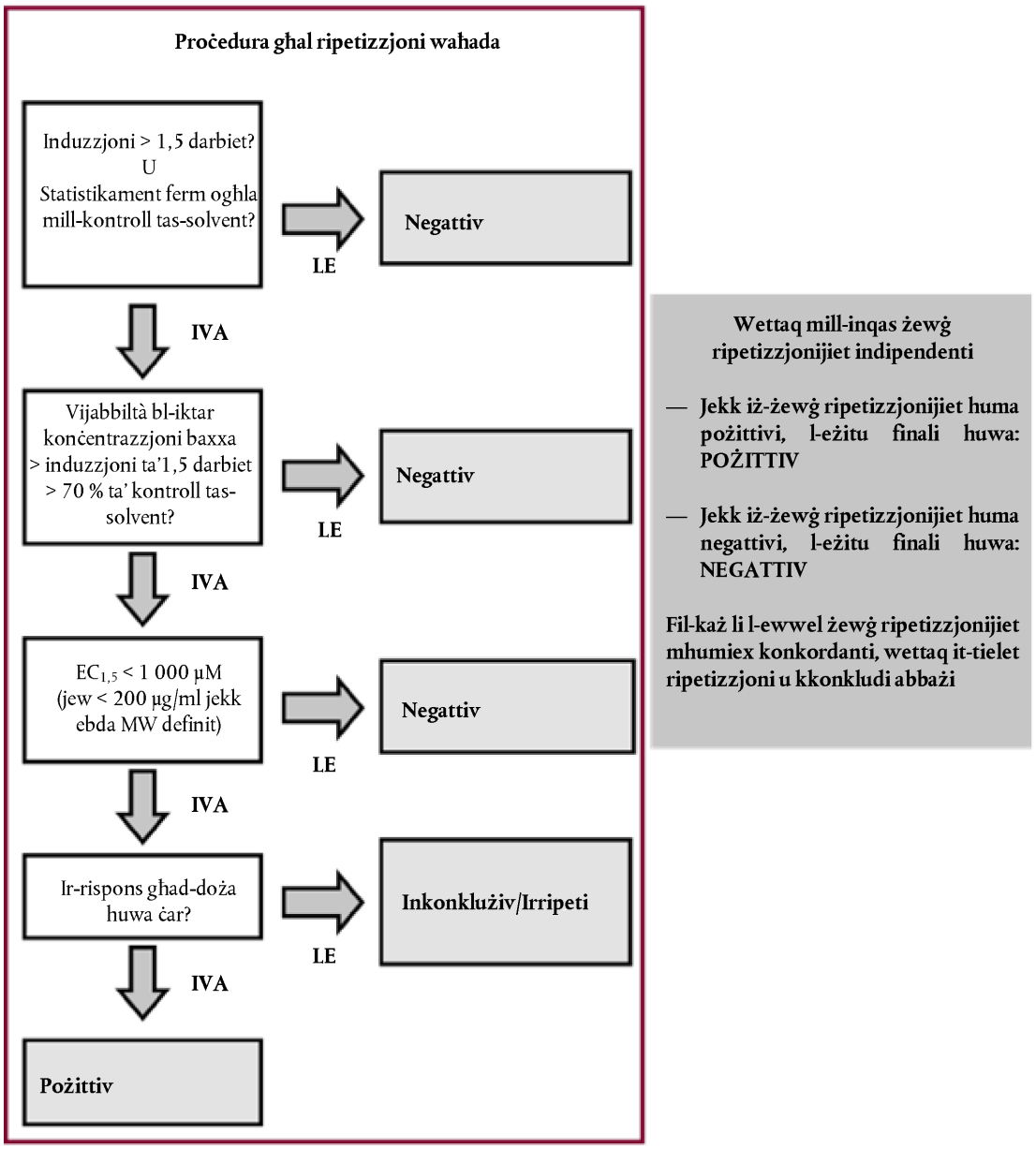
4. hemm rispons għad-doża apparenti kumplessiv għall-induzzjoni ta' luċiferaži (jew rispons bifażiku kif imsemmi fil-paragrafu 33).

▼M7

Jekk f'ripetizzjoni partikolari, jiġu ssodisfati l-ewwel tliet kundizzjonijiet iżda ma jistax jiġi osservat rispons ċar għad-doża għall-induzzjoni ta' luċiferaži, ir-riżultat ta' dik ir-ripetizzjoni għandu jitqies bħala inkonkluživ u jista' jkun hemm bżonn ta' iktar ittestjar (Figura 1). Barra minn hekk, riżultat negattiv miksub b'konċentrazzjonijiet < 1 000 µM (jew < 200 g/ml għal sustanzi kimiċi tat-test mingħajr MW definit) għandu jiġi kkunsidrat bħala inkonkluživ ukoll (ara l-paragrafu 11).

Figura 1

Il-mudell ta' tbassir użat fl-assaġġ KeratinoSens™. Tbassir tal-assaġġ KeratinoSens™ għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 11.



F'każijiet rari, is-sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu l-attività ta' luċiferaži ferm qrib il-livelli ta' tossiċità jistgħu jkunu pożittivi f'ċerti ripetizzjonijiet f'livelli mhux ċitotossiċi (jiġifieri konċentrazzjoni li tistabbilixxi l-$EC_{1.5}$ inqas (<) mill-IC_{30}), u f'ripetizzjonijiet oħrajn f'livelli tossiċi biss (jiġifieri konċentrazzjoni li tiddetermina l-$EC_{1.5}$ ikbar (>) mill-IC_{30}). Dawn is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jerġgħu jiġu ttestjati b'analiżi tar-rispons għad-doża iktar ristretta bl-użu ta' fattur

▼M7

ta' dilwizzjoni inferjuri (eż. dilwizzjoni għal 1,33 jew Öid-doppju (= 1,41) bejn il-bwejriet), sabiex jiġi stabbilit jekk seħħitx induzzjoni f'livelli ċitotossiċi jew le (9).

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test

— Sustanza monokostitwenti

  — Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

  — Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, is-solubilità fid-DMSO, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

  — Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

  — Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

  — Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

  — Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli.

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita:

  — Karatterizzazzjoni safejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara iktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara iktar 'il fuq) tal-kostitwenti, safejn ikunu disponibbli;

  — Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, is-solubilità fid-DMSO u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

  — Il-piż molekolari jew il-piż molekolari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

  — Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

  — Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

  — Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli.

Kontrolli

— Kontroll pożittiv

  — Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

  — Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, is-solubilità fid-DMSO, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;

  — Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

  — Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

  — Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

  — Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli;

▼M7

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.

— Kontroll negattiv (veikolu)

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem/ismijiet IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintużaw kontrolli negattivi / veikoli oħrajn li mhumiex dawk imsemmijin f'dan il-metodu ta' ttestjar u safejn ikunu disponibbli;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;

Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tal-metodu ta' ttestjar użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-faċilità mnejn inkisbet);

— In-numru tal-passaġġ u l-livell ta' konfluwenza ta' ċelloli użati għall-ittestjar;

— Il-metodu ta' għadd taċ-ċelloli għat-tiżrigħ qabel l-ittestjar u l-miżuri meħudin sabiex tiġi żgurata distribuzzjoni omoġena tan-numru ta' ċelloli (ara l-paragrafu 20);

— Il-luminometru użat (eż. il-mudell), inkluż l-issettjar tal-istrument, is-sottostrat ta' luċiferaži użat, u wiri tal-kejliet ta' luminexxenza xierqa fuq il-bażi tat-test tal-kontroll deskritt fl-Appendiċi 3;

— Il-proċedura użata sabiex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju sabiex iwettaq il-metodu ta' ttestjar (eż. billi jiġu ttestjati s-sustanzi ta' profiċjenza) jew sabiex tintwera prestazzjoni riproduċibbli tal-metodu ta' ttestjar matul iż-żmien.

Proċedura tat-test

— In-numru ta' ripetizzjonijiet u repliki użati;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika, il-proċedura ta' applikazzjoni u l-ħin tal-esponiment użat (jekk ikun differenti minn dak rakkomandat)

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

— It-tqegħid f'tabella tal-valuri tal-I_{max}, $EC_{1.5}$ u tal-vijabbiltà (jiġifieri IC_{50}, IC_{30}) miksubin għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontroll pożittiv għal kull ripetizzjoni kif ukoll il-valuri medji (I_{max}: medja; $EC_{1.5}$ u l-valuri tal-vijabbiltà: medja ġeometrika) u SD ikkalkolata bl-użu ta' dejta mir-ripetizzjonijiet individwali kollha u indikazzjoni tal-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont il-mudell ta' tbassir;

▼M7

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni miksub bil-qari tal-valuri tal-luminexxenza għall-kontroll negattiv għal kull esperiment;

— Graff li turi l-kurvi ta' doża — rispons għall-induzzjoni tal-attività ta' luċiferaži u l-vijabbiltà;

— Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-riżultati

— Diskussjoni tar-riżultati miksubin bil-metodu ta' ttestjar tal-assaġġ KeratinoSens$_{TM}$;

— Kunsiderazzjoni tar-riżultati tal-metodu ta' ttestjar fil-kuntest ta' IATA jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjoni

TAGĦRIF

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

(4) Il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi.

(5) Il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda.

(6) Il-Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi. DA.

(7) Il-Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi. BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Available: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta'"rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar (29).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): Sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari għal eżitu ta' interess *in vivo* (2).

ARE: Element tar-rispons tal-antiossidanti (imsejjaħ ukoll EpRE, element tar-rispons tal-elettrofili), huwa element ta' rispons li jinsab fir-reġjun tal-promotur upstream ta' ħafna ġeni ċitoprotettivi u tal-fażi II. Meta jiġi attivat minn Nfr2, iservi ta' medjatur għall-induzzjoni transkrizzjonali ta' dawn il-ġeni.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Koeffiċjent ta' varjazzjoni: Kejl tal-varjabbiltà li huwa kkalkolat għal grupp ta' dejta dwar ir-repliki billi d-devjazzjoni standard tiġi diviża bil-medja. Jista' jiġi mmoltiplikat b'100 għall-espressjoni bħala perċentwal.

$EC_{1,5}$: Il-konċentrazzjoni interpolata għal induzzjoni ta' luċiferaži għal darba u nofs

IC_{30}: Il-konċentrazzjoni li twassal għal tnaqqis ta' 30 % fil-vijabbiltà ċellolari.

IC_{50}: Il-konċentrazzjoni li twassal għal tnaqqis ta' 50 % fil-vijabbiltà ċellolari.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), il-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew grupp ta' sustanzi kimiċi, li tintegra b'mod strutturat u jiżen id-dejta rilevanti kollha sabiex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-ħtieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

I_{max}: Il-fattur ta' induzzjonali massimali tal-attività ta' luċiferaži meta mqabbla mal-kontroll tas-solvent (negattiv) imkejjel fi kwalunkwe konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Keap1: Proteina 1 assoċjata mal-ECH bħall-Kelch, hija proteina sensorjali li tista' tirregola l-attività Nrf2. F'kundizzjonijiet mhux indotti, il-proteina sensorjali Keap1 timmira l-fattur ta' transkrizzjoni tal-Nrf2 għal ubikwitinilazzjoni u degradazzjoni proteolitika fil-proteażoma. Il-modifika kovalenti tar-residwi ta' ċisteina reattiva tal-Keap 1 minn molekoli żgħar tista' twassal għal dissoċjazzjoni ta' Nrf2 minn Keap1 (8) (10) (11).

▼M7

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreaġixxux (1).

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, lifiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-inqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha iktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hija r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hija li taħlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew iktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hija r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

Nrf2: Il-fattur nukleari (derivat mill-eritrojde 2)-bħal 2, huwa fattur ta' transkrizzjoni involut fil-passaġġ tar-rispons tal-antiossidanti. Meta Nrf2 ma jkunx ubikwitinilat, jinġema' fiċ-ċitoplażma u jittrażloka fin-nukleu, fejn jingħaqad mal-ARE fir-reġjun promotur upstream ta' ħafna ġeni ċitoprotettivi, sabiex iniedi t-transkrizzjoni tagħhom (8) (10) (11).

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-preċiżjoni (konkordanza ta' metodu ta' ttestjar) (29).

Affidabilità: Kejliet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbilità fl-istess u bejn il-laboratorarji u r-ripetibilità fl-istess laboratorju (29).

Riproduċibilità: Il-qbil bejn ir-riżultati miksub mill-ittestjar tal-istess sustanza kimika bl-użu tal-istess protokoll tat-test (ara affidabbiltà) (29).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (29).

Kontroll tas-solvent/veikolu: Replika li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test ħlief is-sustanza kimika tat-test, iżda tinkludi s-solvent li jintuża. Jintuża sabiex jiġi stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (29).

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha (1).

Sustanza kimika tat-test: It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża sabiex jirreferi għal dik li qiegħda tiġi ttestjata.

▼M7

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-ħaddiema tal-emerġenza) u l-ambjent (1).

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti b'reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi.

Metodu ta' ttestjar validu: Metodu ta' ttestjar meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabilità għal skop speċifiku u li huwa bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Metodu ta' ttestjar qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (29).

▼M7

Appendiċi 2

SUSTANZI TA' PROFIĊJENZA

Sensitizzazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-ARE-Nrf2 Luciferase

Qabel l-użu ta' rutina ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jiksbu b'mod korrett it-tbassir mistenni ta' KeratinoSens™ għall-10 Sustanzi ta' Profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri tal-$EC_{1,5}$ u IC_{50} li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-inqas 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza. Dawn is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Fost kriterji tal-għażla oħrajn kien hemm id-disponibilità kummerċjali, id-disponibilità ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja u d-disponibilità ta' dejta *in vitro* ta' kwalità għolja mill-assaġġ KeratinoSens™.

Tabella 1

Sustanzi rrakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika mal-assaġġ KeratinoSens™

Sustanzi ta' Profiċjenza	CASRN	Forma Fiżika	Tbassir *In Vivo* (1)	Tbassir KeratinoSens™ (2)	Medda ta' Referenza tal-$EC_{1,5}$ (μM) (3)	Medda ta' Referenza tal-IC_{50} (μM) (3)
Isopropanol	67-63-0	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	> 1 000	> 1 000
Aċidu saliċiliku	69-72-7	Solidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	> 1 000	> 1 000
Aċidu lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	> 1 000	> 1 000
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	> 1 000	> 1 000
Alkoħol taċ-ċinnamil	104-54-1	Solidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	Pożittiv	25 - 175	> 1 000
Dimetakrilat tal-etilen glikol	97-90-5	Likwidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	Pożittiv	5 - 125	> 500
2-Merkaptobenżotjażol	149-30-4	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	Pożittiv	25 - 250	> 500
Glutaronitril tal-metildibromo	35691-65-7	Solidu	Sensitizzatur (qawwi)	Pożittiv	< 20	20 - 100
4-Metilaminofenol sulfat	55-55-0	Solidu	Sensitizzatur (qawwi)	Pożittiv	< 12.5	20 - 200
2,4-Dinitro-klorobenżen	97-00-7	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	Pożittiv	< 12.5	5 - 20

(1) It-tbassiriet tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* huma bbażati fuq dejta tal-LLNA (13). Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (24).

(2) Tbassir ta' KeratinoSens™ għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 11 ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

(3) Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (12).

▼M7

Appendiċi 3

KONTROLL TAL-KWALITÀ TAL-KEJLIET TAL-LUMINEXXENZA

Esperiment bażiku għall-iżgurar ta' kejl ottimali tal-luminexxenza fl-assaġġ KeratinoSens™

It-tliet parametri li ġejjin huma kritiċi għall-iżgurar tal-kisba ta' riżultati affidabbli bil-luminometru:

— li jkun hemm biżżejjed sensittività li tagħti sfond stabbli fi bwejriet tal-kontroll;

— li ma jkun hemm ebda gradjent fuq il-pjastra minħabba ħinijiet twal tal-qari; u

— li ma jkun hemm ebda kontaminazzjoni ta' dawl fil-bwejriet biswit minn bwejriet attivi ħafna.

Qabel l-ittestjar huwa rakkomandat li jiġi żgurat li jkun hemm il-kejliet tal-luminexxenza xierqa, billi tiġi ttestjata pjastra tal-kontroll stabbilita kif deskritt hawn taħt (analiżi tat-triplikati).

L-issettjar tal-pjastri tal-ewwel esperiment ta' taħriġ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0.98**	**EGDMA 1.95**	**EGDMA 3.9**	**EGDMA 7.8**	**EGDMA 15.6**	**EGDMA 31.25**	**EGDMA 62.5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Inbjank**

EGDMA = Dimetakrilat tal-etilen glikol (Nru CAS: 97-90-5) sustanza kimika b'induzzjoni qawwija

CA = Aldeid ċinnamiku, referenza pożittiva (Nru CAS: 104-55-2)

L-analiżi tal-kontroll tal-kwalità għandha turi:

— rispons għad-doża ċar fir-ringiela D, bl-I_{max} > 20 darba ikbar mill-isfond (f'ħafna każijiet, jintlaħqu valuri tal-I_{max} ta' bejn 100 u 300);

— ebda rispons għad-doża fir-ringiela C u E (ebda valur ta' induzzjoni iktar minn 1.5 (idealment mhux iktar minn 1.3) minħabba kontaminazzjoni possibbli tad-dawl, speċjalment qrib bwejriet ferm attivi fir-ringiela tal-EGDMA;

— ebda differenza statistikament sinifikanti bejn ir-ringieli A, B,, E, F u G (jiġifieri ebda gradjent fuq il-pjastra); u

— il-varjabbiltà fi kwalunkwe waħda mir-ringieli A, B,, E, F u G u fil-bwejriet tad-DMSO fir-ringiela H għandha tkun inqas minn 20 % (jiġifieri sfond stabbli).

▼M7

B.61. **METODU TA' TTESTJAR TAT-TNIXXIJA TA' FLUWOREXXEINA GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' KORRUŻIVI OKULARI U IRRITANTI SEVERI**

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 460 tal-OECD (2012). Il-metodu ta' ttestjar tat-Tnixxija tal-Fluworexxeina huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi sabiex jiġu kklassifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) bħala korruživi okulari u irritanti severi, kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (Kategorija 1), ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) ([1]) (Kategorija 1), u (Kategorija I) tal-Aġenzija għall-Protezzjoni tal-Ambjent (EPA) tal-Istati Uniti (1)(2). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, irritanti okulari severi huma definiti bħala sustanzi kimiċi li jikkaġunaw ħsara fit-tessut fl-għajnejn wara l-għoti tas-sustanza kimika tat-test li ma tkunx riversibbli fi żmien 21 jum tal-applikazzjoni jew tikkawża tħassir fiżiku serju tal-vista, filwaqt li korruživi okulari huma sustanzi kimiċi li jikkaġunaw ħsara irriversibbli fit-tessut tal-għajnejn. Dawn is-sustanzi kimiċi huma klassifikati fil-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE, jew il-Kategorija 1 tal-EPA l-Istati Uniti.

Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-FL ma jitqiesx li huwa validu bħala sostitut komplut għat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek, l-FL huwa rakkomandat sabiex jintuża bħala parti minn strateġija ta' ttestjar sekwenzjali għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar regolatorji. B'hekk, l-FL huwa rakkomandat bħala l-ewwel pass fi ħdan approċċ minn Fuq għal Isfel sabiex jiġu identifikati korruživi okulari/irritanti severi, speċifikament għal tipi limitati ta' sustanzi kimiċi (jiġifieri sustanzi u taħlitiet solubbli fl-ilma) (3)(4).

Ġeneralment huwa aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test *in vitro* tal-irritazzjoni tal-għajnejn waħdu ma huwa sejjer ikun kapaċi jieħu post it-test *in vivo* tal-għajnejn (TM B.5 405 (5)) sabiex ibassar il-medda sħiħa ta' irritazzjonijiet għal klassijiet ta' sustanzi kimiċi differenti. Madankollu, it-taħlitiet strateġiċi ta' bosta metodi ta' ttestjar alternattivi fi ħdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu jistgħu jieħdu post it-test *in vivo* tal-għajnejn (4). L-approċċ minn Fuq għal Isfel (4) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija li jkollha potenzjal għoli ta' irritazzjoni.

Fuq il-bażi tal-mudell ta' tbassir spjegat fil-paragrafu 35, il-metodu ta' ttestjar tal-FL jista' jidentifika sustanzi kimiċi fi ħdan dominju ta' applikabilità limitat bħala korruživi okulari/irritanti severi (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti) mingħajr ebda test ieħor. L-istess huwa supponut għat-taħlitiet, għad li t-taħlitiet ma ntużawx fil-validazzjoni. Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-FL jista' jintuża sabiex jistabbilixxi l-irritazzjoni għall-għajnejn/il-korružività tas-sustanzi kimiċi, billi tiġi segwita l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali tat-TM B.5 (5). Madankollu, sustanza kimika li

([1]) Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1

▼M7

mhijiex imbassra bħala korrużiv okulari jew irritant sever bil-metodi ta' ttestjar tal-FL ikollha bżonn tiġi ttestjata f'metodu ta' ttestjar wieħed jew iktar addizzjonali (*in vitro* u/jew *in vivo*) li kapaċi jidentifika bi preċiżjoni i) sustanzi kimiċi li huma korrużivi okulari/irritanti severi foloz negattivi *in vitro* fl-FL (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti); ii) sustanzi kimiċi li mhumiex ikklassifikati għal korrużjoni/irritazzjoni tal-għajnejn (Kategorija Nru tal-GHS tan-NU; Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU: Kategorija IV tal-EPA tal-Istati Uniti); u/jew iii) sustanzi kimiċi li huma irritanti moderati/ħfief għall-għajnejn (Kategoriji 2A u 2B tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE; Kategoriji II u III tal-EPA tal-Istati Uniti);

L-għan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza kimika tat-test li tikkawża korrużività jew irritanza severa potenzjali kif imkejla mill-ħila tagħha li tinduċi ħsara lil monosaff tal-epitelju konfluwenti impermeabbli. L-integrità tal-permeabilità transepiteljali hija funzjoni ewlenija ta' epitelju bħal dak li jinsab fil-konġuntiva u l-kornea. Il-permeabilità transepiteljali hija kkontrollata minn bosta ġunzjonijiet dojoq. Intwera li żieda fil-permeabilità tal-epitelju korneali *in vivo* jikkorrelata mal-livell ta' infjammazzjoni u l-ħsara fil-wiċċ osservata hi u tiżviluppa l-irritazzjoni tal-għajnejn.

Fil-metodu ta' ttestjar tal-FL, l-effetti tossiċi wara ħin tal-esponiment qasir għas-sustanza kimika tat-test jitkejlu minn żieda fil-permeabilità tal-fluworexxeina tas-sodju permezz tal-monosaff epiteljali taċ-ċelloli tal-Kilwa Kanina Madin-Darby (MDCK) ikkulturati fuq inserzjonijiet permeabbli. L-ammont ta' tnixxija ta' fluworexxeina li sseħħ huwa proporzjonat għall-ħsara indotta mis-sustanza kimika fil-ġunzjonijiet dojoq, il-ġunzjonijiet desmożomali u l-membrani taċ-ċelloli, u jista' jintuża sabiex jiġi stmat il-potenzjal ta' tossiċità okulari ta' sustanza kimika tat-test. L-Appendiċi 1 jipprovdi dijagramma taċ-ċelloli tal-MDCK imkabbrin fuq membrana li tiddaħħal għall-metodu ta' ttestjar tal-FL.

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll INVITTOX Nru 71 (6) li ġie evalwat miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM), f'kollaborazzjoni mal-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interaġenzjali tal-Istati Uniti għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM) u ċ-Ċentru Ġappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM).

Il-metodu ta' ttestjar tal-FL mhuwiex rakkomandat sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li għandhom jiġu kklassifikati bħala irritanti ħfief/moderati jew sustanzi kimiċi li ma għandhomx ikunu kklassifikati għal irritazzjoni okulari (sustanzi u taħlitiet) jiġifieri Kat. 2A/2B tal-GHS, ebda kategorija; Kat. 2 tas-CLP tal-UE, ebda kategorija; Kategoriji II/III/IV tal-EPA tal-Istati Uniti), kif muri mill-istudju ta' validazzjoni (3) (7).

Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli biss għal sustanzi kimiċi solubbli fl-ilma (sustanzi u taħlitiet). Il-potenzjal ta' irritazzjoni severa okulari ta' sustanzi kimiċi li huma solubbli fl-ilma u/jew fejn l-effett tossiku mhuwiex affettwat minn dilwizzjoni ġeneralment jitbassar b'mod preċiż bil-metodu ta' ttestjar tal-FL (7). Sabiex sustanza kimika tiġi kategorizzata bħala solubbli fl-ilma, f'kundizzjonijiet sperimentali, għandha tkun solubbli f'Soluzzjoni sterili tal-Melħ Bilanċjata ta' Hanks (HBSS) mingħajr fenol aħmar li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM) f'konċentrazzjoni ta' $\geq$ 250 mg/ml (doża ogħla mil-limitu ta' 100 mg/ml). Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test hija solubbli taħt il-konċentrazzjoni ta' 100 mg/ml, iżda diġà tinduċi induzzjoni tal-FL ta' 20 % f'dik il-konċentrazzjoni (jiġifieri FL_{20} < 100 mg/ml), xorta waħda tista' tiġi kklassifikata bħala tal-Kat. 1 tal-GHS jew Kat. 1 tal-EPA.

Il-limitazzjonijiet identifikati għal dan il-metodu ta' ttestjar jeskludu aċidi u bażijiet b'saħħithom, fissattivi ta' ċelloli u sustanzi kimiċi ferm volatili mid-dominju ta' applikabilità. Dawn is-sustanzi kimiċi għandhom mekkaniżmi li ma jitkejlux mill-metodu ta' ttestjar tal-FL, eż. koagulazzjoni estensia, saponifikazzjoni jew kimiki reattivi speċifiċi. Limitazzjonijiet identifikati oħrajn għal dan il-metodu huma msejsin fuq ir-riżultati għall-kapaċità ta' tbassir għal sustanza kimika tat-test ikkulurita u viskuża (7). Huwa ssuġġerit li ż-żewġ tipi ta' sustanzi kimiċi

▼M7

diffiċli jitneħħew mill-monosaff wara l-perjodu ta' esponiment qasir u li l-prevedibbiltà tal-metodu ta' ttestjar tista' tittejjeb jekk jintuża numru ikbar ta' stadji tal-ħasil. Sustanzi kimiċi solidi sospiżi f'likwidu għandhom il-propensità li jippreċipitaw 'il barra u jaf ikun diffiċli li tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni finali għaċ-ċelloli. Meta s-sustanzi kimiċi ta' dawn il-klassijiet kimiċi u fiżiċi jiġu esklużi mid-database, il-preċiżjoni tal-FL skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS titjieb b'mod sostanzjali (7).

Fuq il-bażi tat-tir ta' dan il-metodu ta' ttestjar (jiġifieri li jidentifika korrużivi okulari/irritanti severi biss), ir-rati ta' foloz negattivi (ara l-Paragrafu 13) mhumiex kritiċi peress li t-tali sustanzi kimiċi mbagħad jiġu ttestjati b'testijiet *in vitro* validati adegwatament oħrajn jew fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ tal-piż tal-evidenza (5) (ara l-paragrafi 3 u 4 ukoll).

Il-limitazzjonijiet identifikati l-oħrajn tal-metodu ta' ttestjar tal-FL huma bbażati fuq rati ta' foloz negattivi u foloz pożittivi. Meta jintuża bħala l-ewwel pass fi ħdan approċċ minn Fuq għal Isfel sabiex jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet korrużivi okulari/irritanti severi solubbli fl-ilma (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti), ir-rata ta' foloz pożittivi għall-metodu ta' ttestjar tal-FL varjat minn 7 % (7/103; GHS tan-NU u CLP tal-UE) sa 9 % (9/99; EPA tal-Istati Uniti) u r-rata ta' foloz negattivi varjat minn 54 % (15/28; EPA tal- Istati Uniti) sa 56 % (27/48; GHS tan-NU u CLP tal-UE) meta mqabblin ma' riżultati *in vivo*. Il-gruppi ta' sustanzi kimiċi li juru riżultati ta' foloz pożittivi u/jew foloz negattivi fil-metodu ta' ttestjar tal-FL mhumiex definiti hawnhekk.

Ċerti limitazzjonijiet tekniċi huma speċifiċi għall-kultura taċ-ċelloli tal-MDCK. Il-ġunzjonijiet dojoq li jimblokkaw il-passaġġ tal-kulurant fluworexxein mill-monosaff dejjem jiġu f'riskju ikbar minħabba numru dejjem ikbar ta' passaġġi ta' ċelloli. Formazzjoni inkompluta tar-riżultati tal-ġunzjonijiet dojoq f'FL ikbar fil-kontroll mhux ittrattat. Għaldaqstant, tnixxija massimali permessibbli definita fil-kontrolli mhux ittrattati hija importanti (ara l-paragrafu 38: tnixxija 0 %). Bħal bl-assaġġi *in vitro* kollha, hemm il-potenzjal li ċ-ċelloli jiġu ttrasformati maż-żmien, u b'hekk huwa vitali li jinbdew il-meded tan-numru ta' passaġġi għall-assaġġi.

Id-dominju ta' applikabilità attwali jista' jiżdied f'ċerti każijiet, iżda biss wara li jiġi analizzatt sett ta' dejta mifrux ta' sustanzi kimiċi tat-test studjati, idealment miksub wara testijiet (3). Dan il-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi aġġornat kif xieraq iktar ma jkun hemm informazzjoni u dejta ġodda kkunsidrati.

Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment ikun qed jistabbilixxi dan l-assaġġ, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 3. Il-laboratorji jistgħu jużaw dawn is-sustanzi kimiċi sabiex juru l-kompetenza teknika tagħhom fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-FL qabel ma jissottomettu dejta tal-assaġġ tal-FL għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-metodu ta' ttestjar tal-FL huwa assaġġ *in vitro* bbażat fuq il-funzjoni taċ-ċelloli u ċ-ċitotossiċità li jsir fuq monosaff konfluwenti ta' ċelloli tal-epitelju tubulari CB997 tal-MDCK li jitkabbru fuq inserzjonijiet semipermeabbli u jimmudellaw l-istat mhux proliferanti tal-epitelju korneali *in vivo*. Il-linja ta' ċelloli tal-MDCK hija ferm stabbilita u tifforma ġunzjonijiet dojoq u ġunzjonijiet desmosomali simili għal dawk li jinstabu fuq in-naħa apika tal-epitelju tal-konġuntiva u tal-kornea. Ġunzjonijiet dojoq u desmosomali *in vivo* jipprevjenu soluti u materjali estranei milli jippenetraw l-epitelju tal-kornea. It-telfien tal-impermeabilità transepiteljali, minħabba l-ġunzjonijiet dojoq u l-ġunzjonijiet desmosomali li jġarrbu ħsara, huwa wieħed mill-avvenimenti bikrin fl-irritazzjoni okulari indotta mis-sustanzi kimiċi.

▼M7

Is-sustanza kimika tat-test hija applikata għas-saff konfluwenti ta' ċelloli mkabbrin fuq in-naħa apika tal-inserzjoni. Normalment tintuża esposizzjoni qasira ta' minuta sabiex tirrifletti r-rata ta' kklerjar normali fl-esponimenti tal-bniedem. Vantaġġ tal-perjodu ta' esponiment qasir huwa li s-sustanzi u t-taħlitiet ibbażati fuq l-ilma jistgħu jiġu ttestjati puri, jekk ikunu jistgħu jitneħħew faċilment wara l-perjodu tal-esponiment. Dan jippermetti li jsiru paraguni iktar diretti tar-riżultati mal-effetti kimiċi fil-bniedem. Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titneħħa u l-kulurant fluworexxein tas-sodju ferm fluworexxenti u mhux tossiku jiżdied man-naħa apika tal-monosaff għal 30 minuta. Il-ħsara kkaġunata mis-sustanza kimika tat-test fil-ġunzjonijiet dojoq tiġi stabbilita bl-ammont ta' fluworexxeina li tnixxi minn ġos-saff taċ-ċelloli fi ħdan perjodu ta' ħin definit.

L-ammont ta' kulurant fluworexxein tas-sodju li jgħaddi minn ġol-monosaff u l-membrana tal-inserzjoni f'volum stabbilit ta' soluzzjoni preżenti fil-bwejra (li fiha jnixxi l-kulurant fluworexxein tas-sodju) jiġi stabbilit billi titkejjel spettrofluworometrikament il-konċentrazzjoni ta' fluworexxeina fil-bwejra. L-ammont ta' tnixxija tal-fluworexxeina (FL) jiġi kkalkolat b'referenza għall-valuri tal-intensità tal-fluworexxenza (FI) miż-żewġ kontrolli: kontroll inbjank, u kontroll tat-tnixxija massima. Il-perċentwal ta' tnixxija u, għalhekk, l-ammont ta' ħsara fl-inġunzjonijiet dojoq huma espressi, b'rabta ma' dawk il-kontrolli, għal kull waħda mill-konċentrazzjonijiet stabbiliti tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad, jiġi kkalkolat l-FL_{20} (jiġifieri l-konċentrazzjoni li tikkawża FL ta' 20 % b'rabta mal-valur irreġistrat għall-monosaff konfluwenti mhux ittrattat u l-inserzjonijiet mingħajr ċelloli). Il-valur tal-FL_{20} (mg/ml) jintuża fil-mudell ta' tbassir għall-identifikazzjoni ta' korrużivi okulari u irritanti severi (ara l-paragrafu 35).

L-irkupru għandu sehem importanti mill-profil tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test li jiġi vvalutat mit-test ta' irritazzjoni okulari *in vivo* wkoll. L-analiżijiet preliminari indikaw li d-dejta dwar l-irkupru (sa 72 siegħa wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test) tista' potenzjalment iżżid il-kapaċità ta' tbassir tal-Protokoll 71 ta' INVITTOX iżda hemm bżonn ta' iktar evalwazzjoni u tkun tibbenefika minn dejta addizzjonali, idealment miksub b'iktar testijiet (6). Dan il-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi aġġornat kif xieraq iktar ma jkun hemm informazzjoni u dejta ġodda kkunsidrati.

PROĊEDURA

Preparazzjoni tal-monosaff ċellolari

Il-monosaff taċ-ċelloli CB997 tal-MDCK jitħejja bl-użu ta' ċelloli sottokonfluwenti li jikbru fi flasks tal-kultura taċ-ċelloli f'DMEM/Taħlita tan-Nutrijenti F12 (1x konċentrat b'L-glutamina, 15 mM HEPES, kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM) u 10 % FCS/FBS inattivat bis-sħana). Fuq kollox, il-media/is-soluzzjonijiet kollha użati fi ħdan l-assaġġ tal-FL għandu jkun fihom kalċju f'konċentrazzjoni ta' bejn 1.8 mM (200 mg/l) u 1.0 mM (111 mg/l) sabiex jiġu żgurati formazzjoni u integrità tal-ġunzjonijiet dojoq. Il-medda tan-numru ta' passaġġi ta' ċelloli għandha tiġi kkontrollata sabiex tiġi żgurata formazzjoni bbilanċjata u riproduċibbli tal-ġunzjonijiet dojoq. Idealment, iċ-ċelloli għandhom ikunu fi ħdan il-medda ta' passaġġi 3-30 mit-taħlil peress li ċ-ċelloli fi ħdan din il-medda ta' passaġġi għandhom funzjonalità simili, li tgħin sabiex ir-riżultati tal-assaġġ ikunu riproduċibbli.

Qabel ma jsir il-metodu ta' ttestjar tal-FL, iċ-ċelloli jinqalgħu mill-flask bi tripsinizzazzjoni, jiġu ċentrifugati u ammont xieraq ta' ċelloli jinżera' fl-inserzjonijiet imqegħdin fi pjastri b'24 bwejra (ara l-Appendiċi 1). Għat-tiżrigħ taċ-ċelloli għandhom jintużaw inserzjonijiet b'dijametru ta' tnax-il mm b'membrana ta' esteri taċ-ċelluloża mħallta, ħxuna ta' 80-150 μm u qies tal-pori ta' 0.45 μm. Fl-istudju ta' validazzjoni, intużaw inserzjonijiet Millicell-HA ta' 12-il mm. Il-proprjetajiet tat-tip ta' inserzjoni u membrana huma importanti peress li dawn jistgħu jaffettwaw it-tkabbir taċ-ċelloli u l-irbit tas-sustanza kimika. Ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi jistgħu jaqbdu mal-membrana tal-inserzjoni Millicell-HA, xi ħaġa li tista' taffettwa l-interpretazzjoni tar-riżultati. Is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza (ara l-Appendiċi 3) għandhom jintużaw sabiex tintwera l-ekwivalenza jekk jintużaw membrani oħrajn.

▼M7

L-irbit tas-sustanza kimika mal-membrana tal-inserzjoni huwa iktar komuni għal sustanzi kimiċi katjoniċi, bħall-klorur tal-benzalkonju, li huma attratti għall-membrana ċċarġjata (7). Is-sustanza kimika li torbot mal-membrana tal-inserzjoni tista' żżid il-perjodu ta' esponiment għas-sustanza kimika, xi ħaġa li twassal għal sopravalutazzjoni tal-potenzjal tossiku tas-sustanza kimika, iżda tista' tnaqqas ukoll it-tnixxija fiżika ta' fluworexxeina minn ġol-inserzjoni bl-irbit tal-kulurant mas-sustanza kimika katjonika marbuta mal-membrana tal-inserzjoni, u dan iwassal għal sottovalutazzjoni tal-potenzjal tossiku tas-sustanza kimika. Dan jista' jiġi ssorveljat minnufih billi l-membrana waħedha tiġi esposta għall-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika ttestjata u mbagħad jiżdied il-kulurant tal-fluworexxeina tas-sodju bil-konċentrazzjoni normali għall-ħin standard (ebda kontroll taċ-ċelloli). Jekk iseħħ l-irbit tal-kulurant tal-fluworexxeina tas-sodju, il-membrana tal-inserzjoni tidher safra wara li jitlaħlaħ il-materjal tat-test. Għal-hekk, huwa essenzjali li wieħed ikun jaf x'inhuma l-proprjetajiet ta' rbit tas-sustanza kimika tat-test sabiex ikun jista' jinterpreta l-effett tas-sustanza kimika fuq iċ-ċelloli.

It-tiżrigħ taċ-ċelloli fuq inserzjonijiet għandu jipproduċu monosaff konfluwenti fi żmien l-esponiment għas-sustanza kimika. $1{,}6 \times 10^5$ ċellola f'kull inserzjoni (400 µl ta' sospensjoni taċ-ċelloli b'densità ta' 4×10^5 ċellola / ml). F'dawn il-kundizzjonijiet, normalment monosaff konfluwenti jinkiseb wara 96 siegħa fil-kultura. L-inserzjonijiet għandhom jiġu eżaminati viżwalment qabel it-tiżrigħ, sabiex jiġi żgurat li kwalunkwe ħsara rreġistrata fil-kontroll viżiv deskritta fil-paragrafu 30 hija dovuta għall-immaniġġjar.

Il-kulturi taċ-ċelloli tal-MDCK għandhom jinżammu f'inkubaturi f'atmosfera umdifikata, f'5 % ± 1 % CO_2 u 37 ± 1 °C. Iċ-ċelloli għandhom ikunu ħielsa minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusis, mikroplażma u fungi.

Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u tal-Kontroll

Għandha titħejja soluzzjoni ewlenija ġdida tas-sustanza kimika tat-test għal kull sessjoni sperimentali u tintuża fi żmien 30 minuta mit-tħejjija. Is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jitħejjew f'HBSS li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM), mingħajr fenol aħmar sabiex jiġi evitat l-irbit tal-proteina tas-seru. Qabel l-ittestjar għandha tiġi vvalutata s-solubilità tas-sustanza kimika f'250 mg/ml fl-HBSS. Jekk f'din il-konċentrazzjoni s-sustanza kimika tifforma sospensjoni jew emulsjoni stabbli (jiġifieri żżomm uniformità u ma tissedimentax u lanqas ma tissepara f'iktar minn fażi waħda) fi 30 minuta, l-HBSS xorta waħda tista' tintuża bħala solvent. Madankollu, jekk jinstab li s-sustanza kimika hija insolubbli fl-HBSS f'din il-konċentrazzjoni, għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' metodi ta' ttestjar oħrajn minflok l-FL. L-użu ta' żejt minerali ħafif bħala solvent, f'każijiet li fihom jinstab li s-sustanza kimika hija insolubbli fl-HBSS, għandu jiġi kkunsidrat bir-reqqa peress li ma hemmx biżżejjed dejta għad-dispożizzjoni sabiex tinħareġ konklużjoni fuq it-twettiq tal-assaġġ tal-FL f'dawn il-kundizzjonijiet.

Is-sustanzi kimiċi kollha li jkunu sejrin jiġu ttestjati jitħejjew f'HBSS sterili mingħajr fenol aħmar li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM) mis-soluzzjoni ewlenija, f'ħames konċentrazzjonijiet dilwiti fuq bażi ta' piż skont il-volum: 1, 25, 100, 250 mg/ml u soluzzjoni pura jew saturata. Meta tiġi ttestjata sustanza kimika solida, għandha tkun inkluża konċentrazzjoni għolja ħafna ta' 750 mg/ml. Din il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika jaf ikollha tiġi applikata fuq iċ-ċelloli bl-użu ta' pipetta bi spostament pożittiv. Jekk jinstab li t-tossiċità taqa' bejn 25 u 100 mg/ml, il-konċentrazzjonijiet addizzjonali li ġejjin għandhom jiġu ttestjati darbtejn: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Il-valur tal-FL_{20} għandu jinkiseb minn dawn il-konċentrazzjonijiet diment li jkunu ġew issodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni.

Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu applikati għall-monosaffi taċ-ċelloli konfluwenti wara li jitneħħa l-medium tal-kultura taċ-ċelloli u wara ħasil darbtejn b'HBSS sterili, sħuna (37 °C), mingħajr fenol aħmar li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM). Qabel, il-filtri jkunu ġew ivverifikati viżwalment għal xi ħsarat preeżistenti li jistgħu jiġu attribwiti bi żball għal inkompatibilitajiet potenzjali mas-sustanzi kimiċi tat-test. Tal-inqas għandhom jintużaw tliet repliki għal kull

▼M7

konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli f'kull sessjoni. Wara minuta esponiment f'temperatura ambjentali, is-sustanza kimika tat-test għandha titneħħa bil-galbu bl-aspirazzjoni, il-monosaff għandu jinħasel darbtejn b'HBSS sterili, sħuna (37 °C), mingħajr fenol aħmar li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM), u t-tnixxija tal-fluworexxeina għandha titkejjel minnufih.

Għandhom jintużaw kontrolli negattivi (NC) u pożittivi (PC) paralleli f'kull sessjoni sabiex jintwera li l-integrità tal-monosaff (NC) u s-sensittività taċ-ċelloli (PC) jaqgħu fi ħdan medda ta' aċċettazzjoni storika definita. Is-sustanza kimika tal-PC issuġġerita hija Brij 35 (Nru CAS 9002-92-0) f'100 mg/ml. Din il-konċentrazzjoni għandha tagħti tnixxija tal-fluworexxeina ta' madwar 30 % (medda aċċettabbli ta' tnixxija tal-fluworexxeina hija ta' 20-40 %, jiġifieri ħsara fis-saff taċ-ċellola). Is-sustanza kimika tal-NC issuġġerita hija f'HBSS (mhux ittrattata, kontroll inbjank) li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM), mingħajr fenol aħmar. Kontroll tat-tnixxija massima għandu jkun inkluż f'kull sessjoni wkoll sabiex ikunu jistgħu jiġu kkalkolati l-valuri tal-FL_{20}. It-tnixxija massima hija stabbilita billi jintużaw inserzjonijiet tal-kontroll mingħajr ċelloli.

Determinazzjoni tal-permeabilità tal-fluworexxeina

Eżatt wara li jitneħħew is-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll, jiżdiedu mal-inserzjonijiet (eż. Millicell-HA) 400µl ta' 0.1 mg/ml soluzzjoni tal-fluworexxeina tas-sodju (0.01 % (w/v) f'HBSS li fiha l-kalċju [f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM], mingħajr fenol). Il-kulturi jinżammu għal 30 minuta f'temperatura ambjentali. Fi tmiem l-inkubazzjoni bil-fluworexxeina, l-inserzjonijiet jitneħħew bil-galbu minn kull bwejra. Il-verifika viżwali ssir fuq kull filtru u tiġi rreġistrata kwalunkwe ħsara li setgħet seħħet matul l-immaniġġjar.

L-ammont ta' fluworexxeina li nixxiet mill-monosaff u l-inserzjoni huwa kkwantifikat fis-soluzzjoni li jibqa' fil-bwejriet wara t-tneħħija tal-inserzjonijiet. Il-kejl isir fi spettrofluworometru f'tul ta' mewġa tal-eċċitazzjoni u l-emissjoni ta' 485 nm u 530 nm, rispettivament. Is-sensittività tal-ispettrofluworometru għandha tiġi ssettjata sabiex ikun hemm l-ikbar differenza numerika bejn l-FL massima (inserzjoni mingħajr ċelloli) u l-FL minima (inserzjoni b'monosaff konfluwenti ttrattati bl-NC). Minħabba d-differenzi fl-ispettrofluworometru użat, huwa ssuġġerit li tintuża sensittività li tagħti intensità tal-fluworexxenza ta' > 4 000 fil-kontroll tat-tnixxija massima tal-fluworexxeina. Il-valur massimu tal-FL ma għandux ikun ikbar minn 9999. L-intensità tat-tnixxija massima tal-fluworexxenza għandha taqa' fi ħdan il-medda lineari tal-ispettrofluworometru użat.

Interpretazzjoni tar-riżultati u l-mudell ta' tbassir

L-ammont ta' FL huwa proporzjonat għall-ħsara indotta mis-sustanza kimika fil-ġunzjonijiet dojoq. Il-perċentwal ta' FL għal kull konċentrazzjoni ttestjata tas-sustanza kimika jiġi kkalkolat mill-valuri tal-FL miksubin għas-sustanza kimika tat-test b'referenza għall-valuri FL mill-NC (qari tal-valuri mill-monosaff konfluwenti taċ-ċelloli ttratatti bl-NC) u kontroll tat-tnixxija massima (qari tal-valuri għall-ammont ta' FL minn ġo inserzjoni mingħajr ċelloli).

L-intensità tal-fluworexxenza tat-tnixxija massima medja = x

L-intensità tal-fluworexxenza tat-tnixxija 0 % medja = y

It-tnixxija 100 % medja tinkiseb bit-tnaqqis tat-tnixxjia 0 % medja mit-tnixxija massima medja,

jiġifieri x – y = z

It-tnixxija perċentwali għal kull doża fissa tinkiseb bit-tnaqqis tat-tnixxija 0 % mill-intensità tal-fluworexxenza medja tat-tliet valuri tar-repliki (m), u bid-diviżjoni ta' dan il-valur bit-tnixxija 100 %, jiġifieri %FL = [(m-y) / z] × 100 %, fejn:

▼M7

m = l-intensità tal-fluworexxenza medja tat-tliet kejliet tar-repliki għall-konċentrazzjoni involuta

% FL = il-perċentwal tal-fluworexxeina li tnixxi minn ġos-saff taċ-ċelloli

Għandha tiġi applikata l-ekwazzjoni li ġejja għall-kalkolu tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li tikkaġuna l-FL 20 %:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

Fejn:

D = % tal-inibizzjoni

A = % ħsara (20 % tnixxija tal-fluworexxeina)

B = % tnixxija tal-fluworexxeina < A

C = % tnixxija tal-fluworexxeina > A

M_C = Konċentrazzjoni (mg/ml) ta' C

M_B = Konċentrazzjoni (mg/ml) ta' B

Il-valur limitu tal-FL_{20} għat-tbassir tas-sustanzi kimiċi bħala korrużivi okulari/irritanti severi jingħata hawn taħt:

FL_{20} (mg/ml)	C&L tal-GHS tan-NU	C&L tas-CLP tal-UE	C&L tal- EPA tal-Istati Uniti
≤ 100	Kategorija 1	Kategorija 1	Kategorija I

C&L: klassifikazzjoni u tikkettar

Il-metodu ta' ttestjar tal-FL huwa rakkomandat biss għall-identifikazzjoni ta' korrużivi okulari u irritanti severi solubbli fl-ilma (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, Kategorij 1 tas-CLP tal-UE, Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti) (ara l-paragrafi 1 u 10).

Sabiex is-sustanzi kimiċi solubbli fl-ilma (sustanzi u taħlitiet) (3) (6) (7) jiġu identifikati bħala "li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn" (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP tal-UE) jew bħala "korrużiv okulari jew irritant sever" (Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti), is-sustanza kimika tat-test għandha tinduċi valur tal-FL_{20} ta' ≤ 100 mg/ml.

Aċċettazzjoni tar-riżultati

Il-valur tat-tnixxija medja massima (x) għandu jkun ogħla minn 4 000 (ara l-paragrafu 31), it-tnixxija 0 % medja (y) għandha tkun 300 jew inqas, u t-tnixxija 100 % medja (z) għandha tkun bejn 3 700 u 6 000.

Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontroll pożittiv jipproduċi ħsara ta' 20 % sa 40 % fis-saff taċ-ċellola (kejl bħala % tat-tnixxija tal-fluworexxeina).

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

Għal kull sessjoni, id-dejta minn bwejriet individwali ta' replika (eż., valuri tal-intensità tal-fluworexxenza u dejta tal-FL perċentwali kkalkolata għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma ta' tabella. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-medji ± SD tal-kejliet tar-repliki individwali f'kull sessjoni.

▼M7

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi Kimiċi tat-Test u tal-Kontroll

— Isem tas-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) pereżempju l-isem strutturali użat mill-Chemical Abstracts Service (CAS), segwit minn ismijiet oħrajn, jekk ikunu magħrufin;

— Numru CAS tas-sustanza kimika, jekk magħruf;

— Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew it-taħlita (f'perċentwal(i) skont il-piż), sakemm din l-informazzjoni tkun disponibbli;

— Il-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti għat-twettiq tal-istudju (eż. l-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, is-solubilità fl-ilma, il-klassi tas-sustanza kimika);

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż. tiswin, tħin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin;

Ġustifikazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u tal-Protokoll Użati

— Għandha tinkludi kunsiderazzjonijiet dwar id-dominju tal-applikabilità u l-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar;

Kundizzjonijiet tat-test

— Deskrizzjoni tas-sistema ta' ċelloli użata, inkluż ċertifikat tal-awtentiċità u l-istatus tal-mikroplażma tal-linja ta' ċelloli;

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata;

— Is-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) tat-test użata;

— Id-durata tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test;

— Id-durata tal-inkubazzjoni bil-fluworexxeina;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati;

— Referenza għad-dejta storika tal-mudell (eż. kontrolli negattivi u pożittivi, sustanzi kimiċi ta' referenza, jekk applikabbli);

— Informazzjoni dwar il-profiċjenza teknika murija mil-laboratorju;

Ir-riżultati

— It-tqassim f'tabella tad-dejta miksuba minn sustanzi kimiċi tat-test u l-kontrolli individwali għal kull sessjoni u kull kejl tar-repliki (inklużi riżultati individwali, medji u SDs individwali);

— Il-klassifikazzjoni(jiet) derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir u/jew il-kriterji tad-deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni ta' effetti osservati oħrajn;

▼**M7**

Diskussjoni tar-Riżultati

— Għandha tinkludi kunsiderazzjonijiet dwar eżitu mhux konklużiv (paragrafu 35: FL_{20} > 100 mg/ml) u iktar testijiet;

Konklużjonijiet.

TAGĦRIF

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9

(5) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, *Irritazzjoni/korrużjoni akuta tal-għajnejn*

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Disponibbli fuq: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

(7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

Appendiċi 1

DIJAGRAMMA TAĊ-ĊELLOLI MDCK IMKABBRIN FUQ MEMBRANA LI TIDDAĦĦAL GĦALL-METODU TA' TTESTJAR TAL-FL

Saff konfluwenti ta' ċelloli MDCK jitkabbar fuq il-membrana semipermeabbli ta' inserzjoni. L-inserzjonijiet jitqiegħdu fil-bwejriet ta' pjastri b'24 bwejra.

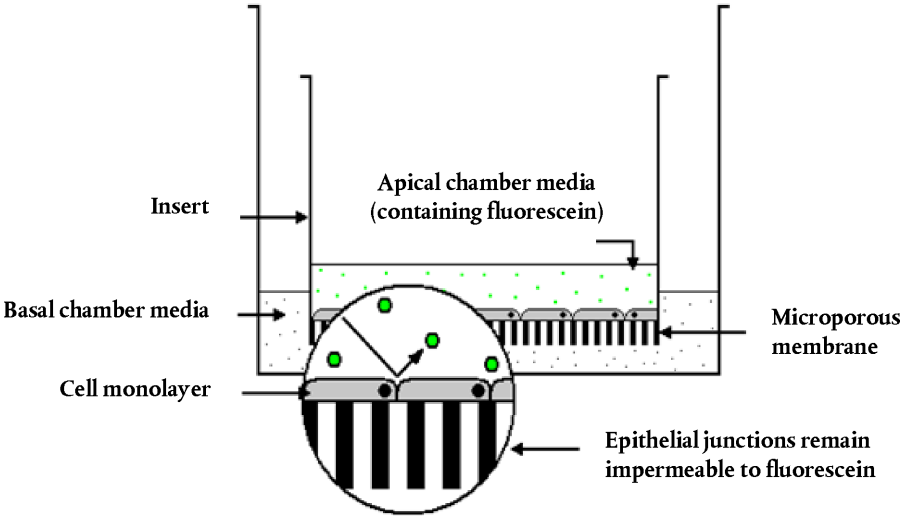


Figura meħuda minn: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

Appendiċi 2

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta'"rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Kategorija I tal-EPA: Sustanzi kimiċi li jipproduċu involviment korrużiv (qerda irriversibbli tat-tessut okulari) jew involviment tal-kornea jew irritazzjoni li tippersisti għal aktar minn 21 jum (2).

CLP tal-UE (Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet): Timplimenta fl-Unjoni Ewropea (UE) is-sistema tal-GHS tan-NU għall-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' foloz pożittivi: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

FL_{20}: Tista' tiġi stmata bid-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika ttestjata tikkawża 20 % tat-tnixxija tal-fluworexxeina mis-saff taċ-ċelloli.

Tnixxija tal-fluworexxeina: l-ammont ta' fluworexxeina li jgħaddi minn ġos-saff taċ-ċellola, imkejjel spettrofluworometrikament.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (NU)): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-ħaddiema tal-emerġenza) u l-ambjent.

Kategorija 1 tal-GHS: Il-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-għajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wiċċ quddiemi tal-għajn, li ma jkunux riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

Taħlita: Użata fil-kuntest tal-GHS tan-NU bħala taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreaġixxux.

Kontroll negattiv: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

▼M7

Mhux ikklassifikati: Sustanzi kimiċi li mhumiex ikklassifikati bħala tal-Kategoriji 1, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 jew 2 tas-CLP tal-UE; jew irritanti okulari tal-Kategorija I, II jew III tal-EPAtal-Istati Uniti.

Korrużiva okulari: (a) Sustanza kimika li tikkawża ħsara irreversibbli fit-tessut għall-għajn; (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala irritanti tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; jew irritanti okulari tal- Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti.

Irritanti okulari: (a) Sustanza kimika li tipproduċi bidla reversibbli fl-għajnejn wara l-applikazzjoni fil-wiċċ anterjuri tal-għajn; (b) Sustanzi kimiċi li huma kklassifikati bħala tal-Kategoriji 2A jew 2B tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE; jew irritanti okulari tal-Kategorija II jew III tal-EPA tal-Istati Uniti.

Irritant sever għall-għajnejn: (a) Sustanza kimika li tikkawża ħsara fit-tessut tal-għajn wara li tiġi applikata fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn u li ma tkunx riversibbli fi żmien 21 jum tal-applikazzjoni jew tikkawża tħassir fiżiku serju tal-vista. (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala irritanti tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; jew irritanti okulari tal- Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u ttrattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun estrem.

Sustanzi Kimiċi ta' Profiċjenza: Sottosett tal-lista ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza li jistgħu jintużaw minn laboratorju naïve sabiex juri profiċjenza bil-metodu ta' ttestjar ta' referenza vvalidat.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-preċiżjoni (konkordanza ta' metodu ta' ttestjar) (8).

Affidabilità: Kejliet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Tiġi vvalutatata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Test ta' sostituzzjoni: Test li huwa mfassal sabiex jieħu post test li huwa f'użu ta' rutina u aċċettat għall-identifikazzjoni tal-perikli u/jew il-valutazzjoni tar-riskji, u li ġie stabbilit li jipprovdi protezzjoni ekwivalenti jew imtejba tas-saħħa tal-bniedem jew tal-annimali jew l-ambjent, skont kif ikun applikabbli, meta mqabbel mat-test aċċettat, għas-sitwazzjonijiet u s-sustanzi kimiċi ta' ttestjar possibbli kollha.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (8).

Hsara serja lill-għajnejn: Hija l-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-għajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wiċċ quddiemi tal-għajn, li ma jkunux riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni.

Kontroll tas-solvent/veikolu: Kampjun mhux ittrattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi pproċessat mal-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi

▼M7

stabbilit ir-rispons baži għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv parallel, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-rilevanza ta' metodu ta' ttestjar.

Sustanza: Użata fil-kuntest tal-GHS tan-NU bħala elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali: Strateġija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi riveduta, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Metodu ta' ttestjar ivvalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar ivvalidat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' preċiżjoni u affidabilità sabiex jitqies aċċettabli għall-għan propost (8).

Piż tal-evidenza: Il-proċess fejn jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' biċċiet ta' informazzjoni varji sabiex tintlaħaq u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza kimika li tkun ta' periklu.

▼M7

Appendiċi 3

SUSTANZI KIMIĊI TA' PROFIĊJENZA GĦALL-METODU TA' TTESTJAR TAL-FL

Qabel l-użu ta' rutina ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-korrużività okulari tat-8 sustanzi kimiċi rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħażlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risposti għal koorużjoni/irritazzjoni tal-għajnejn, li hija bbażata fuq ir-riżultati fit-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (TG 405, TM B.5(5)) (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Mhux Ikklassifikati skont il-GHS tan-NU). Madankollu, fid-dawl tal-utilità vvalidata tal-assaġġ FL (jiġifieri li jidentifika korrużivi okulari/irritanti severi biss), hemm biss żewġ eżiti tat-test għall-finijiet ta' klassifikazzjoni (korrużivi/irritanti severi jew mhux korrużivi/irritanti mhux severi) sabiex tintwera l-profiċjenza. Kriterji tal-għażla oħrajn kienu li s-sustanzi kimiċi huma disponibbli fis-suq, li hemm dejta ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja għad-dispożizzjoni, u li hemm dejta ta' kwalità għolja miksuba mill-metodu ta' ttestjar tal-FL. Għal din ir-raġuni, is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza ntgħażlu mill-"Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing" (8), li ntuża għall-validazzjoni retrospettiva tal-metodu ta' ttestjar tal-FL

Tabella 1

Is-sustanzi kimiċi rakkomandati għall-wiri tal-profiċjenza teknika bl-FL

Sustanza Kimika	NRU CAS	Klassi kimika ([1])	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni In Vivo ([2])	Klassifikazzjoni *In Vitro* ([3])
Klorur tal-benżalkonju (5 %)	8001-54-5	Kompost tal-onju	Likwidu	Kategorija 1	Korrużivi/ Irritanti Severi
Kloridrat tal-prometażina	58-33-3	Amina/Amidina, Eteroċikliku, Kompost tal-kubrit organiku	Solidu	Kategorija 1	Korrużivi/ Irritanti Severi
Idrossidu tas-sodju (10 %)	1310-73-2	Alkali	Likwidu	Kategorija 1	Korrużivi/ Irritanti Severi
Sulfat lauril tas-sodju (15 %)	151-21-3	Aċidu karbossiliku (melħ)	Likwidu	Kategorija 1	Korrużivi/ Irritanti Severi
4-karbossi-benżaldeid	619-66-9	Aċidu karbossiliku, Aldeid	Solidu	Kategorija 2(A)	Mhux korrużivi/ Irritanti mhux severi
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melħ inorganiku	Solidu	Kategorija 2(A)	Mhux korriżivi/ Irritanti mhux severi
Etil-2-metilaċeto-aċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2(B)	Mhux korriżivi/ Irritanti mhux severi
Gliċerol	56-81-5	Alkoħol	Likwidu	Ebda Kategorija	Mhux korriżivi/ Irritanti mhux severi

Taqsiriet: Nru CAS = Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstracts Service

([1]) Klassijiet tas-sustanzi kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza kimika tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, fuq il-bażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-Librerija Nazzjonali tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi tal-Mediċina (MeSH) (disponibbli fuq http// www.nlm.nih.gov/mesh)

([2]) Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405, TM B.5) u bl-użu tal-GHS tan-NU u s-CLP tal-UE.

([3]) Abbażi tar-riżultati miksubin bl-FL (Protokoll INVITTOX Nru 71)

▼M7

B.62. **ASSAĠĠ *IN VIVO* KOMETA TAL-ALKALINI TAL-MAMMIFERI**

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 489 tal-OECD (2016). L-assaġġ kometa alkalin *in vivo* (tal-elettroforeżi b'ġell ta' ċellola waħda) (minn hawn 'il quddiem imsejjaħ sempliċiment l-assaġġ kometa) jintuża għall-identifikazzjoni ta' ksur fil-ħajta tad-DNA f'ċelloli jew nukleji iżolati minn diversi tessuti tal-annimali, normalment rodituri, li ġew esposti għal materjal(i) potenzjalment ġenotossiku. L-assaġġ kometa ġie rivedut u ġew ippubblikati rakkomandazzjonijiet minn bosta gruppi ta' esperti (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Ġie żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (11).

L-iskop tal-assaġġ kometa huwa li jidentifika sustanzi kimiċi li jikkaġunaw ħsara fid-DNA. F'kundizzjonijiet alkalini (> pH 13), l-assaġġ kometa jista' jidentifika ħsara f'ħajta waħda u fit-tnejn, li tirriżulta, pereżempju, minn interazzjonijiet diretti mad-DNA, siti alkali li jinbidlu jew bħala konsegwenza ta' ħsarat tranżjenti fil-ħjut tad-DNA li jirriżultaw minn tiswija ta' qtugħ tad-DNA. Dawn il-ħsarat fil-ħjut jistgħu jissewwew, b'tali mod li ma jwassalx għal effett persistenti, jistgħu jkunu letali għaċ-ċellola, jew jistgħu jissewwew f'mutazzjoni li tirriżulta f'bidla vijabbli permanenti. Jistgħu jwasslu wkoll għal ħsara fil-kromożomi li hija assoċjata wkoll ma' ħafna mardiet tal-bniedem, inkluż il-kanċer.

Prova ta' validazzjoni formali tal-assaġġ kometa *in vivo* fir-rodituri sar fl-2006-2012, koordinat miċ-Ċentru Ġappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM), flimkien maċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM), il-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interaġenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM), u ċ-Ċentru Interaġenzjali tal-NTP għall-Evalwazzjoni ta' Metodi Tossikoloġiċi Alternattivi (NICEATM) (12). Dan il-metodu ta' ttestjar jinkludi l-użu rakkomandat u l-limitazzjonijiet tal-assaġġ kometa, u huwa bbażat fuq il-protokoll finali (12) użat fil-prova ta' validazzjoni, u fuq dejta (proprjetarja tal-laboratorji) addizzjonali rilevanti ppubblikata u mhux ippubblikata.

Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi 1. Huwa osservat li jistgħu jintużaw ħafna pjattaformi differenti għal dan l-assaġġ (lametti tal-mikroskopju, ponot tal-ġell, pjastri b'96 bwejra, eċċ.). Għall-konvenjenza, it-terminu "lametta" jintuża fil-bqija ta' dan id-dokument iżda jkopri l-pjattaformi kollha l-oħrajn.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

L-assaġġ kometa huwa metodu għall-kejl tal-ħsarat fil-ħjut tad-DNA f'ċelloli ewkarjotiċi. Ċelloli individwali/nukleji inkorporati f'agarożju fuq lametta jiġu liżati b'deterġent u konċentrazzjoni għolja ta' melħ. Dan l-istadju tal-liżi jiddiġesti l-membrani ċellolari u nukleari u jippermetti r-rilaxx tal-loops tad-DNA koljati li ġeneralment jissejħu nukleojdi u frammenti tad-DNA. L-elettroforeżi f'riżultati għoljin tal-pH fi strutturi li jixbhu kometi, li, meta jintuża tilwin fluworexxenti, jistgħu jiġu osservati bil-mikroskopija tal-fluworexxenza; il-frammenti tad-DNA jitbiegħdu mir-"ras" lejn id-"denb" fuq il-bażi tal-qies tagħhom, u l-intensità tad-denb tal-kometa b'rabta mal-intensità totali (ras flimkien mad-denb) tirrifletti l-ammont ta' ħsara fid-DNA (13) (14) (15).

L-assaġġ kometa alkalin *in vivo* huwa ta' rilevanza partikolari għall-valutazzjoni tal-periklu ġenotossiku peress li r-risponsi tal-assaġġ jiddependu mill-ADME *in vivo* (assorbiment, distribuzzjoni, metaboliżmu u eskrezzjoni), kif ukoll mill-proċessi ta' tiswija tad-DNA. Dawn jistgħu jvarajw bejn speċi u oħra, tessut u ieħor u bejn it-tipi ta' ħsarat tad-DNA.

▼M7

Sabiex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti ta' trattament xieraq tal-annimali, b'mod partikolari t-tnaqqis fl-użu ta' annimali (bl-Ingliż imsejħin "3Rs — Replacement, Reduction, Refinement- principles" il-prinċipji ta' Sostituzzjoni, Tnaqqis u Rfinar), dan l-assaġġ jista' jiġi integrat ukoll ma' studji tossikoloġiċi oħrajn, eż. studji tat-tossiċità b'doża ripetuta (10) (16) (17), jew il-punt ta' tmiem jista' jiġi kombinat ma' punti ta' tmiem oħrajn tal-ġenotossiċità bħall-assaġġ tal-mikronukleu tal-eritroċiti tal-mammiferi *in vivo* (18) (19) (20). L-assaġġ kometa jsir l-iktar f'rodituri, għad li ġie applikat għal speċijiet mammiferi u mhux mammiferi oħrajn. L-użu ta' speċijiet mhux rodituri għandu jkun iġġustifikat b'mod xjentifiku u etiku fuq il-bażi ta' każ b'każ u huwa tassew rakkomandat li l-assaġġ kometa jsir biss fuq speċijiet li mhumiex rodituri bħala parti minn studju ieħor tat-tossiċità, u mhux bħala test waħdu.

L-għażla tar-rotta tal-esponiment u t-tessut(i) li sejrin jiġu studjati għandha ssir fuq il-bażi tal-għarfien disponibbli/eżistenti kollu dwar is-sustanzi kimiċi tat-test, eż. ir-rotta maħsuba/mistennija tal-esponiment tal-bniedem, il-metaboliżmu u d-distribuzzjoni, il-potenzjal għal effetti fis-sit ta' kuntatt, it-twissijiet strutturali, dejta oħra dwar il-ġenotossiċità jew it-tossiċità, u l-iskop tal-istudju. B'hekk, fejn xieraq, il-potenzjal ġenotossiku tas-sustanzi kimiċi tat-test jista' jiġi vvalutat fit-tessut(i) fil-mira ta' effetti karċinoġeniċi u/jew tossiċi oħrajn. L-assaġġ huwa kkunsidrat siewi wkoll sabiex tkun tista' ssir investigazzjoni ulterjuri tal-ġenotossiċità żvelata minn sistema *in vitro*. Xieraq li jsir assaġġ kometa *in vivo* f'tessut ta' interess meta jista' jkun raġonevolment mistenni li t-tessut ta' interess sejjer ikun espost b'mod adegwat.

L-assaġġ ġie vvalidat bl-iktar mod estensiv f'tessuti somatiċi ta' firien irġiel fi studji kollaborattivi bħall-prova tal-JaCVAM (12) u f'Rothfuss *et al*., 2010 (10). Fil-prova ta' validazzjoni internazzjonali tal-JaCVAM intużaw il-fwied u l-istonku. Il-fwied, għaliex huwa l-iktar organu attiv fil-metaboliżmu tas-sustanzi kimiċi u spiss organiku fil-mira għall-karċinoġeniċità wkoll. L-istonku, għaliex normalment ikun l-ewwel sit ta' kuntatt għas-sustanzi kimiċi wara esponiment orali, għad li żoni oħrajn tal-apparat gastrointestinali bħad-duwodenu u l-ġeġunu għandhom jiġu kkunsidrati wkoll bħala tessuti tas-sit ta' kuntatt u jistgħu jitqiesu li huma iktar rilevanti għal bnedmin mill-istonku glandulari tar-rodituri. Wieħed għandu joqgħod attent li jiżgura li t-tali tessuti ma jkunux esposti għal konċentrazzjonijiet għoljin wisq tas-sustanzi kimiċi tat-test (21). Fil-prinċipju, it-teknika hija applikabbli għal kwalunkwe tessut li minnu jistgħu jinkisbu sospensjonijiet ta' ċellola waħda/nukleji. Id-dejta proprjetarja minn bosta laboratorji turi l-applikazzjoni b'suċċess tagħha għal ħafna tessuti differenti, u hemm ħafna pubblikazzjonijiet li juru l-applikabilità tat-teknika għal organi jew tessuti oħrajn apparti l-fwied u l-istoniku, eż. il-ġeġunu (22), il-kilwa (23) (24), il-ġilda (25) (26), jew il-borża tal-awrina (27) (28), il-fwied u ċ-ċelloli tal-ħasil bronkoalveolari (rilevanti għal studji tas-sustanzi kimiċi meħudin man-nifs) (29) (30), u saru testijiet f'bosta organi wkoll (31) (32).

Filwaqt li jista' jkun hemm interess f'effetti ġenotossiċi f'ċelloli ġerminali, ta' min jgħid li l-assaġġ kometa alkalin standard kif deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar ma jitqiesx li huwa xieraq sabiex jitkejlu l-ħsarat fil-ħjut tad-DNA f'ċelloli ġerminali maturi. Peress li l-livelli ta' sfond varjabbli u għoljin fil-ħsara tad-DNA ġew irrapportati f'reviżjoni tat-tagħrif fuq l-użu tal-assaġġ kometa għall-ġenotossiċità taċ-ċelloli ġerminali (33), jitqies li huwa neċessarju li jsiru modifiki fil-protokoll flimkien ma' standardizzazzjoni aħjar u studji ta' validazzjoni qabel ma l-assaġġ kometa dwar iċ-ċelloli ġerminali maturi (eż. l-isperma) ikun jista' jiġi inkluż fil-metodu ta' ttestjar. Barra minn hekk, ir-reġimen tal-esponiment rakkomandat f'dan il-metodu ta' ttestjar mhuwiex ottimali u jkun hemm bżonn ta' esponimenti itwal jew ħinijiet tal-kampjunar itwal sabiex tkun tista' ssir analiżi sinifikanti tal-ħsarat fil-ħjut tad-DNA fi sperma matura. L-effetti ġenotossiċi kif imkejlin mill-assaġġ kometa f'ċelloli testikolari fi stadji differenti tad-differenzazzjoni ġew deskritti fit-tagħrif (34) (35). Madankollu, ta' min jgħid li l-gonadi fihom taħlita ta' ċelloli somatiċi u ġerminali. Għalhekk, riżultati pożittivi fil-gonad sħiħ (testikoli) mhux bilfors jirriflettu ħsara fiċ-ċellola ġerminali; minkejja dan, jindikaw li s-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) ittestjata u/jew il-metaboliti tagħha laħqu l-gonad.

▼M7

Retikolazzjonijiet ma jistgħux jiġu identifikati b'mod affidabbli fil-kundizzjonijiet sperimentali standard tal-assaġġ kometa. F'ċerti kundizzjonijiet sperimentali modifikati, jistgħu jiġu identifikati retikolazzjonijiet DNA-DNA u DNA-proteina, u modifiki bażi oħrajn bħal bażijiet ossidizzati (23) (36) (37) (38) (39). Iżda jkun hemm bżonn li ssir iktar ħidma sabiex jiġu kkaratterizzati b'mod adegwat il-modifiki neċessarji fil-protokoll. B'ħekk, l-identifikazzjoni ta' aġenti f'retikolazzjoni mhijiex l-iskop primarju tal-assaġġ kif deskritt hawnhekk. L-assaġġ mhuwiex adattat, lanqas b'modifiki, għall-identifikazzjoni ta' anewġeni.

Minħabba l-istat attwali tal-għarfien, bosta limitazzjonijiet oħrajn (ara l-Appendiċi 3) huma assoċjati mal-assaġġ kometa *in vivo*. Huwa mistenni li l-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi rivedut fil-ġejjieni u, jekk hemm bżonn, rivedut fid-dawl tal-esperjenza miksuba.

Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

PRINĊIPJU TAL-METODU

L-annimali huma esposti għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' rotta xierqa. Deskrizzjoni dettaljata tad-dożaġġ u l-kampjunar hija mogħtija fil-paragrafi 36-40. Fil-ħin(ijiet) tal-kampjunar magħżulin, it-tessuti ta' interess huma dissezzjonati u jitħejjew is-sospensjonijiet taċ-ċelloli individwali/in-nukleji (tista' ssir perfużjoni *in situ* meta titqies siewja, eż. il-fwied) u jiġu inkorporati f'agar artab sabiex jiġu immobilizzati fuq lametti. Iċ-ċelloli/nukleji jiġu ttrattati b'bafer tal-liżi sabiex titneħħa l-membrana ċellolari u/jew nukleari, u jiġu esposti għal alkali b'saħħithom, eż. pH≥13 sabiex id-DNA jkun jista' jinħall u jiġu rilaxxati loops u frammenti tad-DNA rilassati. Imbagħad, id-DNA nukleari fl-agar jiġi soġġett għal elettroforeżi. Il-molekoli tad-DNA mhux frammentati normali jibqgħu fil-pożizzjoni fejn kien id-DNA nukleari fl-agar, filwaqt li kwalunkwe loop tad-DNA frammentat u tad-DNA rilassat jimxu lejn l-anodu. Wara l-elettroforeżi, id-DNA jiġi viżwalizzat bl-użu ta' tilwin fluworexxenti xieraq. Il-preparazzjonijiet għandhom jiġu analizzati bl-użu ta' mikroskopju u sistemi ta' analiżi tal-immaġnijiet awtomatizzati għalkollox jew semiawtomatizzati. L-ammont ta' DNA li jimxi matul l-elettroforeżi u d-distanza tal-mixi jirriflettu l-ammont u d-daqs tal-frammenti tad-DNA. Hemm bosta punti ta' tmiem għall-assaġġ kometa. Il-kontenut ta' DNA fid-denb (% tad-DNA tad-dnieb jew % tal-intensità tad-dnieb) ġie rrakkomandat sabiex tiġi vvalutata l-ħsara fid-DNA (12) (40) (41) (42). Wara li jiġi analizzat numru biżżejjed ta' nukleji, id-dejta tiġi analizzata b'metodi xierqa sabiex jiġu ġġudikati r-riżultati tal-assaġġ.

Ta' min jinnota li l-alterazzjoni ta' bosta aspetti tal-metodoloġija, inklużi t-tħejjija tal-kampjuni, il-kundizzjonijiet tal-elettroforeżi, il-parametri tal-analiżi viżwali (eż. l-intensità tat-tilwin, l-intensità tad-dawl mill-bozza tal-mikroskopju, u l-użu ta' filtri tal-mikroskopju u dinamiki tal-kamera) u l-kundizzjonijiet ambjentali (eż. dawl ta' sfond), ġew investigati u jistgħu jaffettwaw il-mixi tad-DNA (43) (44) (45) (46).

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

Kull laboratorju għandu jistabbilixxi kompetenza sperimentali fl-assaġġ kometa billi juri l-ħila li jikseb sospensjonijiet ta' ċelloli individwali jew nukleji ta' kwalità għolja biżżejjed għal kull tessut(i) fil-mira għal kull speċi użata. Il-kwalità tal-preparazzjonijiet sejra tiġi evalwata l-ewwel mill- % tad-DNA tad-dnieb għall-annimali ttrattati bil-veikolu li jaqgħu fi ħdan medda baxxa riproduċibbli. Id-dejta attwali tissuġġerixxi li l- % medju tad-DNA tad-dnieb tal-grupp (fuq il-bażi tal-medja tal-medjani — ara l-paragrafu 57 għal dettalji dwar dawn it-termini) fil-fwied tal-firien idealment ma għandux jaqbeż is-6 %, li jkun konsistenti mal-valuri fil-prova ta' validazzjoni tal-JaCVAM (12) u minn dejta ppubblikata u proprjetarja oħra. Ma hemmx biżżejjed dejta għalissa sabiex issir rakkomandazzjoni dwar il-meded ottimali jew aċċettabbli għal tessuti oħrajn. Dan ma

▼M7

jipprekludix l-użu ta' tessuti oħrajn, jekk dan ikun iġġustifikat. Ir-rapport tat-test għandu jipprovdi reviżjoni xierqa tat-twettiq tal-assaġġ kometa f'dawk it-tessuti b'rabta mat-tagħrif ippubblikat jew minn dejta proprjetarja. L-ewwel nett, medda baxxa ta' % tad-DNA tad-dnieb hija l-ideali sabiex tiġi pprovduta meda dinamika biżżejjed ħalli jiġi identifikat effett pożittiv. It-tieni, kull laboratorju għandu jkun kapaċi jirriproduċi r-risponsi mistennijin għal mutaġeni diretti u promutaġeni, b'modi ta' azzjoni differenti kif issuġġerit fit-Tabella 1 (paragrafu 29).

Jistgħu jintgħażlu sustanzi pożittivi, pereżempju mill-prova ta' validazzjoni tal-JaCVAM (12) jew minn dejta ppubblikata oħra (ara l-paragrafu 9), jekk xieraq, b'ġustifikazzjoni, u billi jintwerew risponsi ċari u pożittivi fit-tessuti ta' interess. Il-ħila li jiġu identifikati effetti dgħajfin ta' mutaġeni magħrufin eż. EMS f'dożi baxxi, għandha tintwera wkoll, pereżempju billi jiġu stabbiliti relazzjonijiet bejn id-doża u r-rispons b'numri u spazjar xierqa tad-dożi. L-isforzi inizjali għandhom jiffokaw fuq l-istabbiliment tal-profiċjenza bl-iktar tessuti użati spiss, eż. fwied tar-rodituri, meta jkun jista' jsir paragun mad-dejta eżistenti u r-riżultati mistennijin (12). Fl-istess ħin tista' tinġabar dejta minn tessuti oħrajn, eż. l-istonku/id-duwodenu/il-ġeġunu, id-demm, eċċ. Il-laboratorju jrid juri l-profiċjenza b'kull tessut individwali f'kull speċi li biħsiebu jistudja, u sejjer ikollu bżonn juri li jista' jinkiseb rispons pożittiv aċċettabbli b'mutaġenu magħruf (eż. EMS) f'dak it-tessut.

Id-dejta tal-kontroll tal-veikolu/negattiv għandha tinġabar sabiex tintwera r-riproduċibbilità tar-risponsi tad-dejta negattivi, u sabiex jiġi żgurat li l-aspetti tekniċi tal-assaġġ kienu kkontrollati kif xieraq jew sabiex jiġi ssuġġerit il-bżonn li jerġgħu jiġu stabbiliti l-meded storiċi tal-kontroll (ara l-paragrafu 22).

Ta' min jinnota li, filwaqt li jistgħu jinġabru bosta tessuti matul in-nekropsija u dawn jistgħu jiġu pproċessati għall-analiżi kometa, il-laboratorju jrid ikun profiċjenti fil-ġbir ta' bosta tessuti minn annimal wieħed, u b'hekk jiġi żgurat li kwalunkwe leżjoni tad-DNA ma tintilifx u l-analiżi kometa ma tkunx f'riskju. It-tul ta' żmien mill-ewtanażja sat-tneħħija tat-tessuti għall-ipproċessar jista' jkun kritiku (ara l-paragrafu 44).

It-trattament xieraq tal-annimali jrid jiġi kkunsidrat filwaqt li tiġi żviluppata l-profiċjenza f'dan it-test u, għalhekk, it-tessuti minn annimali użati f'testijiet oħrajn jistgħu jintużaw meta tiġi żviluppata l-kompetenza fil-bosta aspetti tat-test. Barra minn hekk, jaf ma jkunx hemm bżonn li jsir studju sħiħ matul l-istadji tal-istabbiliment ta' metodu ġdid ta' ttestjar f'laboratorju u jistgħu jintużaw inqas annimali jew konċentrazzjonijiet tat-test meta jiġu żviluppati l-ħiliet meħtieġa.

Dejta storika tal-kontroll

Matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza, il-laboratorju għandu jibni database storika sabiex jistabbilixxi l-meded tal-kontroll pożittiv u negattiv u d-distribuzzjonijiet għat-tessuti u l-ispeċijiet rilevanti. Rakkomandazzjonijiet dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inklużjoni u l-esklużjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (47). Tessuti u speċijiet differenti, kif ukoll veikoli u rotot tal-amministrazzjoni differenti, jistgħu jrendu valuri tal- % tad-DNA tad-dnieb tal-kontroll negattiv differenti. Għaldaqstant, huwa importanti li jiġu stabbiliti meded tal-kontroll negattiv għal kull tessut u speċi. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew

▼M7

X-bar charts (48)), sabiex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-dejta tagħhom, u sabiex juru li l-metodoloġija hija "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom. L-għażla ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv, il-meded tad-doża u l-kundizzjonijiet sperimentali xierqa (eż. il-kundizzjonijiet tal-elettroforeżi) jaf ikollha bżonn tiġi ottimizzata wkoll għall-identifikazzjoni ta' effetti dgħajfin (ara l-paragrafu 17).

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tagħha mad-databases tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Għażla ta' speċi tal-annimali

Normalment jintużaw razez tal-laboratorju komuni ta' rodituri adulti żgħar b'saħħithom (età ta' 6-10 ġimgħat fil-bidu tat-trattament, għad li jistgħu jiġu aċċettati annimali fit ixjaħ ukoll). L-għażla tal-ispeċi ta' rodituri għandha tkun ibbażata fuq (i) speċijiet użati fi studji tat-tossiċità oħrajn (li jridu jkunu kapaċi jikkorrelataw dejta u jippermettu li jsiru studji integrati), (ii) speċijiet li żviluppaw tumuri fi studju tal-karċinoġeniċità (meta ġie investigat il-mekkaniżmu tal-karċinoġenesi), jew (iii) speċijiet l-iktar metaboliżmu rilevanti għall-bniedem, jekk magħrufin. F'dan it-test spiss jintużaw il-firien. Madankollu, jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn jekk ikunu etikament u xjentifikament iġġustifikati.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali

Għar-rodituri, idealment, it-temperatura fil-kamra tal-annimali esperimentali għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). Idealment, l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, u tal-inqas 30 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Ir-rodituri għandhom jitrabbew fi gruppi żgħar (normalment mhux iktar minn ħamsa) tal-istess sess jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom biss jekk dan ikollu ġustifikazzjoni xjentifika. Art solida għandha tintuża kull meta jkun possibbli għaliex art tal-gradilji tista' tikkawża korrimenti serji (49). Irid jiġi pprovdut arrikkiment xieraq tal-bejta.

Preparazzjoni tal-annimali

L-annimali jiġu assenjati b'mod każwali lill-gruppi tal-kontroll u tat-trattament. L-annimali jiġu identifikati b'mod uniku u jitħallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda t-trattament. Irid jintuża l-inqas metodu invażiv ta' identifikazzjoni b'mod uniku tal-annimali. Metodi xierqa jinkludu ċrieki, tikketti, mikroċipep u identifikazzjoni bijometrika. Il-qtugħ tas-swaba' u tal-widnejn mhuwiex xjentifikament iġġustifikat f'dawn it-testijiet. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx ± 20 %.

Preparazzjoni tad-doża

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'veikoli xierqa jew jitħalltu f'dieta jew ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponiment bit-teħid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom (50) (51).

Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

▼M7

Kundizzjonijiet tat-test

Il-veikolu

Il-veikolu ma għandhomx jipproduċu effetti tossiċi fil-volumi tad-doża użati, u ma għandhomx ikunu ssuspettati b'reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw veikoli oħrajn li mhumiex magħrufin sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' dejta ta' referenza li tindika l-kompatibbiltà tagħhom f'termini tal-annimali tat-test, ir-rotta tal-amministrazzjoni u l-punt ta' tmiem. Huwa rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Ta' min jgħid li ċerti veikoli (speċjalment veikoli viskuży) jistgħu jinduċu infjammazzjoni u jżidu l-livelli ta' sfond tal-ħsarat fil-ħjut tad-DNA fis-sit ta' kuntatt, speċjalment b'amministrazzjonijiet multipli.

Kontrolli

Kontrolli pożittivi

Bħalissa, ma' kull test normalment għandhom ikunu inklużi tal-inqas 3 annimali analizzabbli ta' sess wieħed, jew ta' kull sess jekk jintużaw it-tnejn (ara l-paragrafu 32), ittrattati b'sustanza tal-kontroll pożittiv. Fil-ġejjieni, jaf ikun possibbli li tintwera profiċjenza adegwata sabiex jonqos il-bżonn ta' kontrolli pożittivi. Jekk jintużaw bosta ħinijiet tal-kampjunar (eż. bi protokoll tal-amministrazzjoni wieħed), hemm bżonn li jkunu inklużi biss kontrolli pożittivi f'wieħed mill-ħinijiet tal-kampjunar, iżda għandu jkun żgurat disinn ibbilanċjat (ara l-paragrafu 48). Ma hemmx bżonn li jiġu amministrati sustanzi tal-kontroll pożittiv parallel mill-istess rotta bħas-sustanza kimika tat-test, għad li huwa importanti li tintuża l-istess rotta meta jitkejlu l-effetti fis-sit ta' kuntatt. Is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv għandhom ikunu murijin li jinduċu ħsarat fil-ħjut tad-DNA fit-tessuti ta' interess kollha għas-sustanza kimika tat-test, u EMS aktarx li jkun il-kontroll pożittiv tal-għażla peress li pproduċa ħsarat fil-ħjut tad-DNA fit-tessuti kollha li ġew studjati. Id-dożi tas-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom jintgħażlu sabiex jipproduċu effetti moderati li jivvalutaw b'mod kritiku l-prestazzjoni u s-sensittività tal-assaġġ u jistgħu jkunu bbażati fuq il-kurvi ta' doża — rispons stabbilita mil-laboratorju matul il-wiri tal-profiċjenza. Il- % tad-DNA tad-dnieb fl-annimali tal-kontroll pożittiv parallel għandu jkun konsistenti mal-medda tal-laboratorju prestabbilita għal kull tessut individwali u ħin tal-kampjunar għal dik l-ispeċi (ara l-paragrafu 16). Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv u uħud mit-tessuti fil-mira (f'rodituri) tagħhom. Jistgħu jintgħażlu sustanzi li mhumiex fost dawk mogħtijin fit-Tabella 1 jekk ikunu ġġustifikati xjentifikament.

Tabella 1

Eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv u uħud mit-tessuti fil-mira tagħhom

Sustanzi u Nru RN tas-CAS
Etil metansulfonat (RN tas-CAS 62-50-0) għal kwalunkwe tessut
Etil nitrosurea (RN tas-CAS 759-73-9) għal fwied u stonku, duwodenu jew ġeġunu
Metil metansulfonat (RN tas-CAS 66-27-3) għal fwied, stonku, duwodenu jew ġeġunu, fwied u ċelloli tal-ħasil bronkoalveolari (BAL), kilwa, bużżieqa tal-awrina, pulmun, testikoli u mudullun tal-għadam/demm
N-Metil-N′-nitro-N-nitrosogwanidina (RN tas-CAS: 70-25-7) għal stonku, duwodenu jew ġeġunu
1,2-Dimetilidrażina 2HCl (RN tas-CAS 306-37-6) għal fwied u intestin
N-metil-N-nitrosurea (RN tas-CAS 684-93-5) għal fwied, mudullun tal-għadam, demm, kilwa, stonku, ġeġunu u moħħ.

▼M7

Kontrolli negattivi

Grupp ta' annimali tal-kontroll negattiv, ittrattati b'veikolu waħdu, u fil-bqija ttrattati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, għandu jkun inkluż ma' kull test għal kull ħin tal-kampjunar u tessut. Il- % tad-DNA tad-dnieb fl-annimali tal-kontroll negattiv għandu jkun fi ħdan il-medda prestabbilita ta' sfond tal-laboratorju għal kull tessut individwali u ħin tal-kampjunar għal dik l-ispeċi (ara l-paragrafu 16). Fin-nuqqas ta' dejta storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huwa indott ebda effet dannuż jew ġenotossiku mill-veikolu magħżul, min-numru ta' amministrazzjonijiet jew mir-rotta tal-amministrazzjoni, l-istudji inizjali għandhom isiru qabel ma jsir l-istudju sħiħ, sabiex tiġi stabbilita l-aċċettabilità tal-kontroll tal-veikolu.

PROĊEDURA

In-numru u s-sess tal-annimali

Għad li ftit li xejn hemm dejta fuq annimali nisa li minnhom jista' jsir paragun bejn is-sessi b'rabta mal-assaġġ kometa, b'mod ġenerali, risponsi tal-ġenotossiċità *in vivo* oħrajn huma simili bejn annimali rġiel u annimali nisa u, għalhekk, ħafna mill-istudji jistgħu jsiru f'kull sess. Dejta li turi d-differenzi rilevanti bejn l-irġiel u n-nisa (eż. differenzi fit-tossiċità sistemika, il-metaboliżmu, il-bijodisponibilità, eċċ. inkluż, eż. fi studju għat-tiftix tal-medda) tħeġġeġ l-użu taż-żewġ sessi. F'dan il-każ, jaf ikun xieraq li jsir studju fiż-żewġ sessi, eż. bħala parti minn studju ripetut tat-tossiċità tad-doża. Jaf ikun xieraq li jintuża d-disinn fattorjali f'każ li jintużaw iż-żewġ sessi. Dettalji dwar kif tiġi analizzata d-dejta bl-użu ta' dan id-disinn huma mogħtijin fl-Appendiċi 2.

Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju (u matul l-istabbiliment tal-profiċjenza) għandhom jiġu stabbiliti bil-għan li jiġu pprovduti tal-inqas 5 annimali analizzabbli ta' sess wieħed, jew ta' kull sess jekk jintużaw it-tnejn, għal kull grupp (inqas fil-grupp tal-kontroll pożittiv parallel — ara l-paragrafu 29). Fejn l-esponiment umana għas-sustanzi kimiċi tista' tkun speċifika għas-sess, bħal ma jseħħ pereżempju għal ċerti prodotti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq. Bħala gwida għal rekwiżiti tipiċi massimi tal-annimali, studju mwettaq skont il-parametri stabbiliti fil-paragrafu 33 bi tliet gruppi tad-doża u kontrolli negattivi u pożittivi paralleli (kull grupp imsawwar minn ħames annimali ta' sess uniku), ikun jeħtieġ bejn 25 u 35 annimal.

SKEDA TAT-TRATTAMENT

L-annimali għandhom jingħataw trattamenti kuljum għal jumejn jew iktar (jiġifieri żewġ trattamenti jew iktar f'intervalli ta' madwar 24 siegħa), u l-kampjuni għandhom jinġabru darba sagħtejn sa sitt sigħat (jew fit-T_{max}) wara l-aħħar trattament (12). Kampjuni minn reġimi tad-doża estiżi (eż. dożaġġ kuljum għal 28 jum) jistgħu jiġu aċċettati. Intweriet b'suċċess it-taħlita tal-analiżi tal-kometa u t-test tal-mikronuklei tal-eritroċiti (10) (19). Madankollu, trid tingħata kunsiderazzjoni bir-reqqa lil-loġistika involuta fil-kampjunar tat-tessuti għall-analiżi tal-kometi flimkien mar-rekwiżiti tal-kampjunar tat-tessut għal tipi oħrajn ta' valutazzjonijiet tossikoloġiċi. F'ħafna każijiet, il-ġbir 24 siegħa wara l-aħħar doża, li huwa tipiku għal studju tat-tossiċità ġenerali, mhuwiex adattat (ara l-paragrafu 40 dwar il-ħin tal-kampjunar). L-użu ta' skedi tat-trattament u tal-kampjunar oħrajn għandu jkun iġġustifikat (ara l-Appendiċi 3). Pereżempju, trattament wieħed b'kampjunar multiplu jista' jintuża, iżda ta' min jgħid li dan ikun jeħtieġ iktar annimali għal studju b'amministrazzjoni waħda minħabba l-bżonn ta' bosta drabi tal-kampjunar, iżda kultant dan jista' jkun aħjar, eż. meta s-sustanza kimika tat-test tinduċi tossiċità eċċessiva wara amministrazzjonijiet ripetuti.

▼M7

Isir kif isir it-test, jista' jiġi aċċettat diment li s-sustanza kimika tat-test tagħti rispons pożittiv jew, għal studju negattiv, diment li tkun ingħatat l-evidenza diretta jew indiretta li ssostni l-esponiment ta', jew it-tossiċità għat-tessut(i) fil-mira jew jekk tinkiseb id-doża limitu (ara l-paragrafu 36).

Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw ukoll bħala doża maqsuma, jiġifieri żewġ trattamenti fl-istess ġurnata separati b'mhux iktar minn sagħtejn jew tlieta) sabiex jiġi ffaċilitat l-għoti ta' volum kbir. F'dawn iċ-ċirkustanzi, il-ħin tal-kampjunar għandu jiġi skedat fuq il-bażi tal-ħin tal-aħħar dożaġġ (ara l-paragrafu 40).

Livelli tad-doża

Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda dejta xierqa disponibbli minn studji rilevanti oħrajn sabiex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jrid jintuża fl-istudju ewlieni skont l-approċċi attwali għat-twettiq ta' studji ta' individwazzjoni tad-doża. L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala d-doża li tinduċi effetti tossiċi ħfief b'rabta mad-durata tal-perjodu ta' studju (pereżempju, sinjali kliniċi ċari bħal imġiba jew reazzjonijiet anormali, dipressjoni minuri tal-piż tal-ġisem jew ċitotossiċità tat-tessut fil-mira), iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigħ, tbatija jew diffikultà li tirrekjedi l-ewtanażja. Għal sustanza kimika tat-test mhux tossika, b'perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew iktar, id-doża (limitu) massima hija ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Għal perjodi ta' għoti ta' 14-il jum jew inqas, id-doża (limitu) massimu hija ta' 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn regolamenti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw.

Sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni tal-proprjetajiet tossikokinetiċi, jew jinduċu proċessi ta' ditossifikazzjoni li jistgħu jwasslu għal tnaqqis fl-esponiment wara għoti fit-tul jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' ssettar tad-doži u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

Kemm għal verżjonijiet akuti kif ukoll dawk sottoakuti tal-assaġġ kometa, minbarra d-doża massima (MTD, doża massima fattibbli, esponiment massimu jew doża limitu), għandha tingħażel sekwenza dixxendenti ta' tal-inqas żewġ livelli tad-doża addizzjonali differenti biżżejjed (idealment separati b'inqas minn 10) għal kull ħin tal-kampjunar sabiex jintwerew ir-risponsi relatati mad-doża. Madankollu, il-livelli tad-doża użati idealment għandhom ikopru wkoll medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew ebda tossiċità. Meta tiġi osservata tossiċità tat-tessut fil-mira fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, huwa rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'doži mhux tossiċi (ara l-paragrafi 54-55). Studji li jkollhom l-għan li jinvestigaw iktar bis-sħiħ il-forma tal-kurva ta' doża — rispons jistgħu jeħtieġu grupp(i) tad-doża addizzjonali.

Amministrazzjoni tad-Doži

Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħażlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-teħid man-nifs, intratrakeali, jew b'impjant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħażel sabiex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Ġeneralment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li mhijiex rotta tipikament rilevanti ta' esponiment tal-bniedem, u din għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika (eż. ċerti sustanzi tal-kontroll pożittiv, għal

▼M7

finijiet investigattivi, jew għal ċerti mediċini li jingħataw mir-rotta intraperitoneali). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet fl-ilma fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ikbar minn dan (jekk ikunu permessi mil-leġiżlazzjoni dwar it-trattament xieraq tal-annimali) għandu jkun iġġustifikat. Kull meta jkun possibbli, għandhom jinkisbu livelli tad-doża differenti billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni tal-formulazzjoni tad-dożaġġ sabiex jiġi volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

Hin tal-Kampjunar

Il-ħin tal-kampjun huwa varjabbli kruċjali għaliex huwa stabbilit mill-perjodu meħtieġ sabiex is-sustanzi kimiċi tat-test jilħqu l-konċentrazzjoni massima fit-tessut fil-mira u sabiex jiġu indotti l-ħsarat fil-ħjut tad-DNA iżda qabel ma jitilqu jew jissewwew dawn il-ħsarat u qabel ma dawn iwasslu għall-mewt taċ-ċelloli. Il-persistenza ta' wħud mil-leżjonijiet li jwasslu għall-ħsarat fil-ħjut tad-DNA identifikati mill-assaġġ kometa tista' tkun qasira ħafna, tal-inqas għal uħud mis-sustanzi kimiċi ttestjati *in vitro* (52) (53). Għalhekk, jekk ikun hemm suspett ta' leżjonijiet tad-DNA trażjenti bħal dawn, għandhom jittieħdu miżuri sabiex jiġi mitigat it-telf tagħhom billi jiġi żgurat li jittieħed kampjun tat-tessuti minn kmieni, forsi qabel il-ħinijiet prestabbiliti mogħtijin hawn taħt. Il-ħin(ijiet) tal-kampjunar ottimali jista' jkun speċifiku għas-sustanza kimika jew ir-rotta li tirriżulta, pereżempju, f'esponiment rapidu tat-tessut b'amministrazzjoni ġol-vina jew esponiment bit-teħid man-nifs. Għalhekk, meta tkun disponibbli, il-ħinijiet tal-kampjunar għandhom ikunu stabbiliti minn dejta kinetika (eż. il-ħin (T_{max}) li fih tinkiseb il-quċċata tal-plażma jew il-konċentrazzjoni fit-tessut (C_{max}), jew fl-istat stabbli għal amministrazzjonijiet multipli). Fin-nuqqas ta' dejta kinetika, kompromess xieraq għall-kejl tal-ġenotossiċità huwa li jittieħed kampjun wara sagħtejn sa sitt sigħat mill-aħħar trattament għal żewġ trattamenti jew iktar, jew wara sagħtejn sa sitt sigħat u sittax sa sitta u għoxrin siegħa wara amministrazzjoni waħda, għad li wieħed għandu joqgħod attent li ssir nekropsija lill-annimali kollha fl-istess ħin wara l-aħħar (jew l-unika) doża. Tista' tintuża wkoll informazzjoni dwar id-dehra tal-effetti tossiċi fl-organi fil-mira (jekk disponibbli) sabiex jingħażlu l-iktar ħinijiet tal-kampjunar xierqa.

Osservazzjonijiet

Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali marbutin mas-saħħa fuq l-annimali u dawn għandhom jiġu rreġistrati tal-inqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrin jidhru l-iktar l-effetti antiċipati (54). Tal-inqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. Għal studji b'durata itwal, l-annimali kollha għandhom jintiżnu tal-inqas darba fil-ġimgħa, u meta jispiċċa l-perjodu ta' ttestjar. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ikel u tal-inqas darba fil-ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-inqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanazzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar, u ġeneralment ma jintużawx għall-analiżi kometa.

Ġbir tat-Tessuti

Peress li huwa possibbli li l-induzzjoni tal-ħsarat fil-ħjut tad-DNA (kometi) tiġi studjata prattikament fi kwalunkwe tessut, il-ġustifikazzjoni għaliex intgħażel it-tessut(i) li jrid jinġabar għandha tkun definita ċara u bbażata fuq ir-raġuni għat-twettiq tal-istudju flimkien ma' kwalunkwe dejta dwar l-ADME, il-ġenotossiċità, il-karċinoġeniċità jew dejta oħra dwar it-tossiċità għas-sustanzi kimiċi tat-test investigati. Fatturi importanti x'jiġu kkunsidrati għandhom jinkludu r-rotta tal-amministrazzjoni (fuq il-bażi tar-rotta (jew rotot) tal-esponiment probabbli tal-bniedem), id-distribuzzjoni u l-assorbiment tat-tessut imbassrin, ir-rwol tal-metaboliżmu u l-mekkaniżmu possibbli ta' azzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test. Il-fwied kien l-iktar tessut studjat spiss u li fuqu hemm l-iktar dejta. Għaldaqstant, fin-nuqqas ta' kwalunkwe informazzjoni ta' sfond, u jekk ma jiġi identifikat ebda tessut speċifiku ta' interess, il-kampjunar tal-fwied ikun iġġustifikat peress li

▼M7

dan huwa sit primarju ta' metaboliżmu ksenobijotiku u spiss ikun espost ħafna kemm għal sustanza/sustanzi prinċipali kif ukoll metabolita/i. F'ċerti każijiet, l-eżaminazzjoni ta' sit ta' kuntatt dirett (pereżempju, għal sustanzi kimiċi mogħtijin oralment, l-istonku glandulari jew id-duwodenu/ġeġunu, jew għal sustanzi kimiċi meħudin man-nifs, il-pulmun) tista' tkun l-iktar rilevanti. Għandhom jintgħażlu tessuti addizzjonali jew alternattivi fuq il-bażi tar-raġunijiet speċifiċi li għalihom qiegħed isir it-test iżda jista' jkun siewi li jiġu eżaminati bosta tessuti fl-istess annimali diment li l-laboratorju jkun wera li huwa profiċjenti b'dawk it-tessuti u kompetenti fl-immaniġġjar ta' bosta tessuti fl-istess ħin.

Preparazzjoni tal-kampjuni

Għall-proċessi deskritti fil-paragrafi li ġejjin (44-49), importanti li s-soluzzjonijiet jew is-sospensjonijiet stabbli kollha jintużaw sad-data ta' skadenza tagħhom, jew inkella jiġu ppreparati ġodda jekk ikun hemm bżonn. Anki fil-paragrafi li ġejjin, il-ħinijiet meħudin sabiex (i) jitneħħa kull tessut wara n-nekropsija, (ii) jiġi pproċessat kull tessut f'sospensjonijiet taċ-ċelloli/nukleji, u (iii) tiġi pproċessata s-sospensjoni u jiġu ppreparati l-lametti lkoll jitqiesu varjabbli kritiċi (ara Definizzjonijiet, Appendiċi 1), u t-tul aċċettabbli ta' żmien għal kull wieħed minn dawn l-istadi għandu jkun ġie stabbilit matul it-tfassil tal-metodu u l-wiri tal-profiċjenza.

L-annimali sejrin jiġu ewtanazzati, b'mod konsistenti mal-leġiżlazzjoni effettiva dwar it-trattament xieraq tal-annimali u l-prinċipji 3Rs, fil-ħin(ijiet) xieraq wara l-aħħar trattament b'sustanza kimika tat-test. It-tessut(i) magħżul jitneħħa, jiġi dissezzjonat, u sehem minnu jinġabar għall-assaġġ kometa, filwaqt li fl-istess ħin għandha tinqata' biċċa mill-istess parti tat-tessut u titqiegħed fis-soluzzjoni tal-formaldeid jew fissattiv xieraq għall-analiżi tal-istopatoloġija possibbli (ara l-paragrafu 55) skont il-metodi standard (12). It-tessut għall-assaġġ kometa jitqiegħed f'bafer tat-tqattigħ, imlaħlaħ biżżejjed b'bafer tat-tqattigħ kiesaħ sabiex jitneħħa d-demm residwu, u jinħażen f'bafer tat-tqattigħ kiesaħ silġ sakemm jiġi pproċessat. Tista' ssir perfużjoni *in situ* wkoll, eż. għall-fwied, kilwa.

Jeżistu ħafna metodi ppubblikati għall-iżolament taċ-ċelloli/nuklei. Dawn jinkludu t-tqattigħ tat-tessuti bħall-fwied u l-kilwa, il-brix tal-uċuħ mukożali fil-każ tal-apparat gastrointestinali, l-omoġenizzazzjoni u d-diġestjoni enzimika. Il-prova tal-validazzjoni tal-JaCVAM studjat biss ċelloli iżolati, u għalhekk f'termini ta' stabbiliment tal-metodu u sabiex ikun jista' jsir riferiment għad-dejta tal-prova tal-JaCVAM għall-wiri tal-profiċjenza, aħjar jintużaw ċelloli iżolati. Madankollu, intwera li essenzjalment ma hemm ebda differenza essenzjali fir-riżultat tal-assaġġ bejn meta jintużaw ċelloli iżolati u meta jintużaw nuklei iżolati (8). Anki metodi differenti sabiex jiġu iżolati ċ-ċelloli/in-nukleji (eż. omoġenizzazzjoni, tqattigħ, diġestjoni enzimatika u filtrazzjoni bix-xibka) taw riżultati komparabbli (55). Konsegwentement, jistgħu jintużaw ċelloli iżolati jew nukleji iżolati. Laboratorju għandu jevalwa bir-reqqa u jivvalida l-metodi speċifiċi għat-tessut ta' iżolament ta' ċelloli/nukleji individwali. Kif diskuss fil-paragrafu 40, il-persistenza ta' wħud mil-leżjonijiet li jwasslu għall-ħsarat fil-ħjut tad-DNA identifikati mill-assaġġ kometa tista' tkun qasira ħafna (52) (53). Għaldaqstant, ikun xi jkun il-metodu użat sabiex jitħejjew is-sospensjonijiet taċ-ċelloli/nukleji individwali, importanti li t-tessuti jiġu pproċessati mill-iktar fis possibbli wara li l-annimali jkunu ġew ewtanazzati u jitqiegħdu f'kundizzjonijiet li jnaqqsu t-tneħħija tal-leżjonijiet (eż. billi t-tessut jinżamm f'temperatura baxxa). Is-sospensjonijiet taċ-ċelloli għandhom jinżammu kiesħin silġ sakemm ikunu lesti sabiex jintużaw, sabiex ikun jista' jintwera li hemm varjazzjoni minima bejn il-kampjuni u risponsi tal-kontroll pożittiv u negattiv xierqa.

▼M7

PREPARAZZJONI TAL-LAMETTI

Il-preparazzjoni tal-lametti għandha ssir mill-iktar fis possibbli (idealment f'temp ta' siegħa) wara l-preparazzjoni taċ-ċelloli/nukleji individwali, iżda t-temperatura u l-ħin bejn il-mewt tal-annimal u l-preparazzjoni tal-lametta għandhom ikunu kkontrollati bir-reqqa u vvalidati fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Il-volum tas-sospensjoni taċ-ċelloli miżjuda mal-agarożju b'punt tat-tidwib baxx (normalment 0.5-1.0 %) sabiex isiru l-lametti ma għandux inaqqas il-perċentwal tal-agarożju b'punt tat-tidwib baxx għal inqas minn 0.45 %. Id-densità ottimali taċ-ċelloli sejra tiġi stabbilita bis-sistema ta' analiżi tal-immaġnijiet użata għall-għadd tal-kometi.

Il-liżi

Il-kundizzjonijiet tal-liżi huma varjabbli b'mod kritiku wkoll u jistgħu jxekklu fil-ħsarat fil-ħjut li jirriżultaw minn tipi speċifiċi ta' modifiki tad-DNA (ċerti alkilazzjonijiet tad-DNA u addotti bażi). Għaldaqstant huwa rakkomandat li l-kundizzjonijiet tal-liżi jinżammu l-iktar kostanti possibbli għal-lametti kollha fi ħdan esperiment. Ladarba jitħejjew, il-lametti għandhom jitgħaddsu f'soluzzjoni tal-liżi mkessħa għal tal-inqas siegħa (jew tul il-lejl) f'madwar 2-8 °C f'kundizzjonijiet ta' dawl bati eż. dawl isfar (jew fid-dlam) li jevitaw esponiment għal dawl abjad li jista' jkun fih komponenti tal-UV. Wara dan il-perjodu ta' inkubazzjoni, il-lametti għandhom jitlaħalħu sabiex jitneħħa d-deterġent u l-imluħ residwi qabel l-istadju ta' taħlil tal-alkali. Dan jista' jsir bl-użu ta' ilma purifikat, bafer ta' newtralizzazzjoni jew bafer tal-fosfat. Jista' jintuża wkoll bafer tal-elettroforeżi. Dan iżomm il-kundizzjonijiet alkalini fil-kompartiment tal-elettroforeżi.

Taħlil u elettroforeżi

Il-lametti għandhom jitqiegħdu b'mod aleatorju fuq il-pjattaforma ta' unità tal-elettroforeżi tat-tip sottomarin li jkun fiha biżżejjed soluzzjoni tal-elettroforeżi b'tali mod li l-uċuħ tal-lametti jkunu mgħottijin għalkollox (il-fond li fih huma mgħottijin għalkollox għandu jkun konsistenti bejn sessjoni u oħra wkoll). F'tip ieħor ta' unitajiet tal-elettroforeżi tal-assaġġ kometa, jiġifieri bi tkessiħ attiv, ċirkulazzjoni u provvista tal-enerġija b'kapaċità għolja, soluzzjoni li tgħatti iktar fonda tirriżulta f'kurrent elettriku ikbar filwaqt li l-vultaġġ jibqa' kostanti. Għandu jintuża disinn ibbilanċjat sabiex il-lametti jitqiegħdu fit-tank tal-elettroforeżi sabiex jiġu mitigati l-effetti ta' kwalunkwe xejra jew effett fit-tarf ġewwa t-tank u sabiex titnaqqas kemm jista' jkun il-varjabbiltà bejn lott u ieħor, jiġifieri f'kull sessjoni tal-elettroforeżi, għandu jkun hemm għandu jkun inkluż l-istess numru ta' lametti minn kull annimal fl-istudju u kampjuni mill-gruppi tad-dożaġġ differenti, il-kontrolli negattivi u pożittivi. Il-lametti għandhom jitħallew għal tal-inqas 20 minuta sabiex id-DNA jinħall mill-koljatura, u mbagħad jiġu soġġetti għal elettroforeżi f'kundizzjonijiet ikkontrollati li sejrin jimmassimizzaw is-sensittività u l-medda dinamika tal-assaġġ (jiġifieri f'livelli aċċettabbli ta % tad-DNA tad-dnieb għal kontrolli negattivi u pożittivi li jimmassimizzaw is-sensittività). Il-livell tal-migrazzjoni tad-DNA huwa assoċjat b'mod lineari mad-durata tal-elettroforeżi, u anki mal-potenzjal (V/cm). Fuq il-bażi tal-prova tal-JaCVAM, dan jista' jkun 0.7 V/cm għal tal-inqas 20 minuta. Id-durata tal-elettroforeżi titqies li hija varjabbli kritiku u l-ħin tal-elettroforeżi għandu jiġi stabbilit sabiex tiġi ottimizzata l-medda dinamika. Ħinijiet itwal tal-elettroforeżi (eż. 30 jew 40

▼M7

minuta sabiex tiġi massimizzata s-sensittività) normalment iwasslu għal risponsi pożittivi iktar b'saħħithom b'mutaġeni magħrufin. Madankollu, ħinijiet itwal tal-elettroforeżi jistgħu jwasslu wkoll għal migrazzjoni eċċessiva fil-kampjuni tal-kontroll. F'kull esperiment, il-vultaġġ għandu jinżamm kostanti, u l-varjabbiltà fil-parametri l-oħrajn għanda tkun fi ħdan medda ristretta u speċifikata, pereżempju fil-prova tal-JaCVAM 0.7 V/cm fornew kurrent tal-bidu ta' 300 mA. Il-fond tal-bafer għandu jiġi aġġustat sabiex jinkisbu l-kundizzjonijiet meħtieġa u għandu jinżamm matul l-esperiment kollu. Il-kurrent fil-bidu u fi tmiem il-perjodu tal-elettroforeżi għandu jiġi rreġistrat. Għaldaqstant, il-kundizzjonijiet ottimali għandhom jiġu stabbiliti matul il-wiri inizjali tal-profiċjenza fil-laboratorju kkonċernat b'kull tessut studjat. It-temperatura tas-soluzzjoni tal-elettroforeżi permezz tat-taħlil u l-elettroforeżi għandha tinżamm baxxa, normalment 2-10 °C (10). It-temperatura tas-soluzzjoni tal-elettroforeżi fil-bidu tat-taħlil, il-bidu tal-elettroforeżi, u tmiem l-elettroforeżi għandha tiġi rreġistrata.

Wara li titlesta l-elettroforeżi, il-lametti għandhom jitgħaddsu/jitlaħalħu fil-bafer ta' newtralizzazzjoni għal tal-inqas 5 minuti. Il-ġellijiet jistgħu jitlewnu u jingħataw punteġġ "friski" (eż. fi żmien jum jew jumejn) jew jistgħu jiġu deidratati sabiex jingħataw punteġġ iktar tard (eż. fi żmien ġimgħa jew ġimagħtejn wara t-tilwin) (56). Madankollu, il-kundizzjonijiet għandhom jiġu vvalidati matul il-wiri tal-profiċjenza u d-dejta storika għandha tinkiseb u tinżamm b'mod separat għal kull waħda minn dawn il-kundizzjonijiet. Fl-aħħar każ, il-lametti għandhom jiġu deidratati b'immersjoni fl-etanol assolut għal tal-inqas 5 minuti, jitħallew jinxfu bl-arja, u mbagħad jinħażnu, jew f'temperatura ambjentali jew inkella f'kontenitur fi friġġ sakemm jingħataw punteġġ.

Metodi tal-Kejl

Il-kometi għandhom jingħataw punteġġ b'mod kwantitattiv bl-użu ta' sistema awtomatizzata jew semiawtomatizzata ta' analiżi tal-immaġnijiet. Il-lametti sejrin jitlewnu b'tilwin fluworexxenti xieraq, eż. SYBR Gold, Green I, jodur tal-propidju jew bromur tal-etidju u jitkejlu b'lenti ffokata kif xieraq (eż. 200x) taħt mikroskopju mgħammar b'epifluworexxenza u detetturi xierqa jew kamera diġitali (eż. CCD).

Iċ-ċelloli jistgħu jiġu kklassifikati fi tliet kategoriji kif deskritti fl-atlas tal-immaġnijiet tal-kometa (57), jiġifieri jistgħu jingħaddu, ma jistgħux jingħaddu u "qanfud" (ara l-paragrafu 56 għal diskussjoni iktar dettaljata). Ċelloli li jistgħu jingħaddu biss (ras u denb definiti ċari bla ebda interferenza ma' ċelloli biswit) għandhom jingħaddu għall- % tad-DNA tad-dnieb sabiex jiġu evitati artefatti. Ma hemmx bżonn li tiġi rrapportata l-frekwenza taċ-ċelloli li ma jistgħux jingħaddu. Il-frekwenza tal-qniefed għandha tiġi stabbilita fuq il-bażi tal-punteġġ viżwali (peress li n-nuqqas ta' ras definita ċara sejjer ifisser li ma jistgħux jiġu identifikati minnufih bl-analiżi tal-immaġnijiet) ta' tal-inqas 150 ċellola għal kull kampjun (ara l-paragrafu 56 għal diskussjoni iktar dettaljata) u dokumentata għaliha.

Il-lametti kollha għall-analiżi, inklużi dawk tal-kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati b'mod indipendenti u jingħaddu "mgħammdin" sabiex min jaqrahom ma jkunx jaf x'inhi l-kundizzjoni tat-trattament. Għal kull kampjun (għal kull tessut għal kull annimal), għandhom jiġu analizzati tal-inqas 150 ċellola (esklużi qniefed — ara l-paragrafu 56). L-għadd ta' 150 ċellola għal kull annimal f'tal-inqas 5 annimali għal kull doża (inqas fil-kontroll pożittiv parallel — ara l-paragrafu 29) jipprovdi saħħa statistika adegwata skont l-analiżi ta' Smith *et al*., 2008 (5). Jekk jintużaw il-lametti, dan jista' jkun minn 2 jew 3 lametti magħdudin għal kull kampjun meta jintużaw ħames annimali għal kull grupp. Għandhom jiġu osservati bosta partijiet tal-lametta f'densità li tiżgura li ma jkun hemm ebda trikkib tad-dnieb. Għandu jiġi evitat l-għadd fit-truf tal-lametti.

Il-ħsarat fil-ħjut tad-DNA fl-assaġġ kometa jistgħu jitkejlu b'punti ta' tmiem indipendenti bħall- % tad-DNA tad-dnieb, it-tul tad-denb u l-mument tad-denb. It-tliet kejliet kollha kemm huma jistgħu jsiru jekk tintuża s-sistema xierqa ta' softwer ta' analiżi tal-immaġnijiet. Madankollu, il- % tad-DNA tad-dnieb (magħruf ukoll bħala l- % tal-intensità tad-dnieb) huwa rakkomandat għall-evalwazzjoni u l-interpretazzjoni tar-riżultati (12) (40) (41) (42), u huwa stabbilit bl-intensità tal-frammenti tad-DNA fid-denb espressa bħala perċentwal tal-intensità totali taċ-ċellola (13).

▼M7

Hsara fit-tessut u ċitotossiċità

Sejbiet pożittivi fl-assaġġ kometa jaf ma jkunux dovuti biss għall-ġenotossiċità, it-tossiċità tat-tessut fil-mira tista' tirriżulta wkoll f'żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA (12) (41). Għall-kuntrarju, ċitotossiċità baxxa jew moderata spiss tidher b'ġenotossini magħrufin (12), xi ħaġa li turi li mhwuiex possibbli li ssir distinzjoni bejn migrazzjoni tad-DNA indotta mill-ġenotossiċità u dik indotta miċ-ċitotossiċità fl-assaġġ kometa waħdu. Madankollu, meta jiġu osservati żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA, huwa rakkomandat li ssir eżaminazzjoni ta' indikatur wieħed jew iktar taċ-ċitotossiċità peress li din tista' tgħin fl-interpretazzjoni tas-sejbiet. Żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA fil-preżenza ta' evidenza ċara ta' ċitotossiċità għandhom jiġu interpretati bil-galbu.

Ġew proposti ħafna kejliet taċ-ċitotossiċità u, minn dawn, il-bidliet istopatoloġiċi jitqiesu li huma kejl rilevanti tat-tossiċità tat-tessut. Osservazzjonijiet bħal infjammazzjoni, infiltrazzjoni taċ-ċelloli, bidliet apoptotiċi jew nekrotiċi ġew assoċjati ma' żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA, madankollu, kif muri mill-prova ta' validazzjoni tal-JaCVAM (12), ma hemm ebda lista definittiva ta' bidliet istopatoloġiċi li dejjem ikunu assoċjati ma' migrazzjoni ikbar tad-DNA għad-dispożizzjoni. Anki bidliet fil-kejliet tal-kimika klinika (eż. AST, ALT) jistgħu jipprovdu informazzjoni siewja fuq il-ħsarat fit-tessut u jistgħu jiġu kkunsidrati wkoll indikaturi addizzjonali bħal attivazzjoni tal-kaspaži, tilwin TUNEL, tilwin tal-Annessin V, eċċ. Madankollu, ftit li xejn hemm dejta ppubblikata fejn dawn tal-aħħar intużaw għal studji *in vivo* u whud jaf ikunu inqas affidabbli minn oħrajn.

Qniefed (jew sħabiet, ċelloli fatati) huma ċelloli li jesibixxu immaġni mikroskopika li tikkonsisti f'ras żgħira jew ineżistenti, u dnieb diffużi twal u jitqiesu li huma ċelloli li ġarrbu ħsara kbira, għad li l-etjoloġija tal-qniefed mhijiex ċerta (ara l-Appendiċi 3). Minħabba d-dehra tagħhom, il-kejliet tal- % tad-DNA tad-dnieb bl-analiżi tal-immaġnijiet ma jitsgħux jinqraw u, għalhekk, il-qniefed għandhom jiġu evalwati b'mod separat. Għandha tittieħed nota u tiġi rrapportata l-okkorrenza tal-qniefed u kwalunkwe żieda rilevanti li hija ssuspettata li hija dovuta għas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi investigata u interpretata bil-galbu. L-għarfien tal-modalità ta' azzjoni potenzjali tas-sustanzi kimiċi tat-test jista' jgħin fit-tali kunsiderazzjonijiet.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

L-annimal huwa l-unità sperimentali u, għalhekk, kemm id-dejta dwar l-annimali individwali kif ukoll ir-riżultati miġburin fil-qosor għandhom jiġu ppreżentati f'forma ta' tabelli. Minħabba l-għamla ġerarkika tad-dejta, huwa rakkomandat li jiġi stabbilit il- % medju tad-DNA tad-dnieb għal kull lametta u li jiġi kkalkolat il-medju tal-valuri medjani għal kull annimal (12). Imbagħad tiġi stabbilita l-medja tal-medji tal-annimal individwali sabiex tingħata medja tal-grupp. Dawn il-valuri kollha għandhom ikunu inklużi fir-rapport. Jistgħu jintużaw approċċi alternattivi (ara l-paragrafu 53) jekk ikunu xjentifikament u statistikament iġġustifikati. L-analiżi statistika tista' ssir bl-użu ta' firxa ta' approċċi (58) (59) (60) (61). Meta jintgħażlu l-metodi statistiċi li sejrin jintużaw, il-ħtieġa ta' trasformazzjoni (eż. log jew għerq kwadrat) tad-dejta u/jew żieda ta' numru żgħir (eż. 0.001) għall-valuri kollha (anki mhux żero) sabiex jiġu mitigati l-effetti tal-valuri taċ-ċelloli żero, għandhom jiġu kkunsidrati kif diskuss fir-referenzi msemmijin hawn fuq. Fl-Appendiċi 2 jingħataw id-dettalji tal-analiżi tal-interazzjonijiet bejn it-trattament u s-sess meta jintużaw iż-żewġ sessi, u l-analiżi sussegwenti tad-dejta meta jinstabu differenzi jew ma tinstab ebda differenza. Għandha tiġi rrapportata dejta dwar it-tossiċità u s-sinjali kliniċi wkoll.

Kriterji ta' Aċċettabilità

L-aċċettazzjoni ta' test hija bbażata fuq il-kriterji li ġejjin:

a. Il-kontroll negattiv parallel jitqies aċċettabbli għaż-żieda fid-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 16.

▼M7

b. Il-kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 29) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fid-database storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv parallel.

c. Ġew analizzati numri adegwati ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet (paragrafi 52 u 36-38).

d. Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafu 36.

Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk:

a. tal-inqas waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel,

b. iż-żieda hija marbuta mad-doża meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

c. kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv għal speċijiet, veikolu, rotta u tessut partikolari u numru ta' amministrazzjonijiet.

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi ħsara fil-ħjut tad-DNA fit-tessuti studjati f'din is-sistema tat-test. Jekk huwa ssodisfat kriterju wieħed jew tnejn minn dawn il-kriterji, ara l-paragrafu 62.

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk:

a. l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel,

b. ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

c. ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv għal speċijiet, veikolu, rotta u tessut partikolari u numru ta' amministrazzjonijiet.

d. tkun ingħatat l-evidenza diretta jew indiretta li ssostni l-esponiment ta', jew it-tossiċità għat-tessut(i) fil-mira.

Is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi ħsara fil-ħjut tad-DNA fit-tessuti studjati f'din is-sistema tat-test.

Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

F'każ li r-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar (jiġifieri mhumiex issodisfati l-kriterji kollha elenkati fil-paragrafi 59 jew 60) u sabiex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-dejta għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri mwettqin, jekk ikunu ġġustifikati xjentifikament. L-għadd ta' ċelloli addizzjonali (fejn xieraq) jew it-twettiq ta' esperiment ripetut possibilment bl-użu ta' kundizzjonijiet ottimizzati tal-esperiment (eż. spazjar tad-dożi, rotot oħrajn tal-amministrazzjoni, ħinijiet tal-kampjunar oħrajn jew tessuti oħrajn) jista' jkun siewi.

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' dejta sejjer jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u, għalhekk, sejjer jiġi konklużiv bħala ekwivoku.

▼M7

Sabiex tiġi vvalutata r-rilevanza bijoloġika ta' riżultat pożittiv jew ekwivoku, hemm bżonn ta' informazzjoni dwar iċ-ċitotossiċità fit-tessut fil-mira (ara l-paragrafi 54-55). Meta sejbiet pożittivi jew ekwivoċi jiġu osservati biss fil-preżenza ta' evidenza ċara ta' ċitotossiċità, l-istudju jiġi konkluż bħala ekwivoku għall-ġenotossiċità sakemm ma jkunx hemm biżżejjed informazzjoni li ssostni konklużjoni definittiva. Fil-każijiet ta' eżitu tal-istudju negattiv fejn ikun hemm sinjali ta' tossiċità fid-dożijiet kollha ttestjati, jista' jkun xieraq li jsir studju ulterjuri b'doži mhux tossiċi.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test, id-data limitu għall-użu jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solvent/veikolu:

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu;

— is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

— il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet tad-doża;

— id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż., l-istabilità, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali).

L-annimali tat-test:

— l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjonijiet xjentifiċi u etiċi għall-għażla;

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-abitazzjoni, id-dieta, l-arrikkiment, eċċ.;

— il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test, inklużi l-medda tal-piż tal-ġisem, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv (veikolu/solvent);

▼M7

— riżultati mill-istudju għat-tiftix tal-medda (jekk sar);

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni;

— is-sit tal-injezzjoni (għal studji taħt il-ġilda jew ġol-vina);

— metodi għall-preparazzjoni tal-kampjun, fejn disponibbli, analiżijiet istopatoloġiċi, speċjalment għal sustanza kimika li tagħti rispons pożittiv tal-kometa;

— ir-raġuni għall-għażla tat-tessut;

— il-metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laħqet it-tessut fil-mira, jew iċ-ċirkolazzjoni ġenerali, jekk jinkisbu riżultati negattivi;

— id-doża propja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tad-dieta u tal-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata tal-iskedi tat-trattament u tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet (eż. dejta tossikokinetika, fejn disponibbli);

— il-metodu ta' taffija mill-uġigħ, l-analġeżija;

— il-metodu tal-ewtanażja;

— il-proċeduri għall-iżolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;

— il-metodi għall-preparazzjoni tas-sospensjoni taċ-ċellola/nukleu individwali;

— is-sors u n-numru tal-lott tar-reaġenti kollha (fejn possibbli);

— il-metodi għall-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità;

— il-kundizzjonijiet tal-elettroforeżi;

— it-tekniki tat-tilwin użati; u

— il-metodi għall-għadd u l-kejl tal-kometi.

Ir-riżultati:

— L-osservazzjonijiet kliniċi ġenerali, jekk jeżistu, qabel u matul il-perjodu ta' ttestjar għal kull annimal;

— evidenza taċ-ċitotossiċità jekk issir;

▼M7

— għal studji itwal minn ġimgħa: Il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju, inklużi l-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp; il-konsum tal-ikel;

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn tkun evidenti;

— għal kull tessut/annimal, il- % tad-DNA tad-dnieb (jew kejliet oħrajn, jekk jintgħażlu) u l-valuri medjani għal kull lametta, il-valuri medji għal kull annimal u l-valuri medji għal kull grupp;

— dejta ta' kontroll negattiv konkurrenti u storiku b'meded, medji/medjani u devjazzjonijiet standard għal kull tessut evalwat;

— dejta storika tal-kontroll pożittiv u parallel;

— għal tessuti li mhumiex il-fwied, kurva ta' doża — rispons bl-użu tal-kontroll pożittiv. Din tista' tkun minn dejta miġbura matul il-wiri tal-profiċjenza (ara l-paragrafi 16-17) u għandha tkun akkumpanjata minn ġustifikazzjoni, b'referenzi mit-tagħrif attwali, għax-xerqien tal-kobor u t-tifrix tar-risponsi għall-kontrolli f'dak it-tessut;

— l-analiżijiet statistiċi u l-metodi applikati; u l-kriterji sabiex rispons jitqies pożittiv, negattiv jew ekwivoku;

— il-frekwenza ta' qniefed f'kull grupp u għal kull annimal.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjoni

Referenzi

TAGĦRIF

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

(28) (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

(50) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness: *Tossiċità ta' Inalazzjoni Subakuta: Studju ta' 28 Jum.*

(51) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: *Tossiċità ta' Inalazzjoni Subkronika: Studju ta' 90 Jum.*

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

(54) OECD (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Elettroforeżi alkalina b'ġell ta' ċellola waħda: Teknika sensittiva għall-identifikazzjoni ta' ħsara primarja fid-DNA fil-livell ta' ċelloli/nukleu individwali.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

Kometa: Il-forma li jadottaw in-nukleojdi wara li jiġu sottomessi għal kamp elettroforetiku wieħed, minħabba s-similarità tiegħu għall-kometi: ir-ras hija n-nukleu u d-denb huwa kostitwit mid-DNA li jimxi 'l barra min-nukleu fil-kamp elettriku.

Varjabbli/parametru kritiku: Dan huwa varjabbli tal-protokoll li għalih bidla żgħira jista' jkollha impatt kbir fuq il-konklużjoni tal-assaġġ. Varjabbli kritiċi jistgħu jkunu speċifiċi għat-tessut. Varjabbli kritiċi ma għandhomx ikunu mibdulin, speċjalment f'test, mingħajr ma jiġi kkunsidrat kif l-alterazzjoni sejra tibdel rispons tal-assaġġ, pereżempju kif indikat mill-kobor u l-varjabilità fil-kontrolli pożittivi u negattivi. Ir-rapport tat-test għandu jelenka l-alterazzjonijiet tal-varjabbli kritiċi li saru matul it-test jew imqabblin mal-protokoll standard għal-laboratorju u jipprovdi ġustifikazzjoni għal kull alterazzjoni.

L-intensità tad-dnieb jew il- % tad-DNA tad-dnieb: Dan jikkorrispondi għall-intensità tad-denb tal-kometa fir-rigward tal-intensità totali (ras u denb). Dan jirrifletti l-ammont ta' ħsara fid-DNA, espressa bħala perċentwal.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti b'reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi.

▼M7

Appendiċi 2

ID-DISINN FATTORJALI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TAD-DIFFERENZI BEJN IS-SESSI FL-ASSAĠĠ KOMETA *IN VIVO*

Id-disinn fattorjali u l-analiżi tiegħu

F'dan id-disinn, jiġu ttestjati tal-inqas 5 irġiel u 5 nisa f'kull livell tal-konċentrazzjoni li jirriżultaw f'disinn li juża tal-inqas 40 annimal (20 raġel u 20 mara, flimkien ma' kontrolli pożittivi rilevanti).

Id-disinn, li huwa wieħed mill-iktar disinni fattorjali sempliċi, huwa ekwivalenti għal analiżi bidirezzjonali tal-varjanza bis-sess u l-livell ta' konċentrazzjoni li huma l-effetti ewlenin. Id-dejta tista' tiġi analizzata billi jintużaw pakketti ta' softwer statistiku standard bħal SPSS, SAS, STATA, Genstat kif ukoll bl-użu ta' R.

L-analiżi tagħmel partizzjoni tal-varjabbiltà fis-sett ta' dejta bejn is-sessi, bejn il-konċentrazzjonijiet u b'rabta mal-interazzjoni bejn is-sessi u l-konċentrazzjonijiet. Kull wieħed mit-termini jiġi ttestjat kontra stima tal-varjabbiltà bejn l-annimali rreplikati fi ħdan il-gruppi ta' annimali tal-istess sess bl-istess konċentrazzjoni. Id-dettalji sħaħ dwar il-metodoloġija sottostanti huma disponibbli f'ħafna kotba standard dwar l-istatistika (ara r-referenzi) u fil-faċilitajiet tal-għajnuna pprovduti mal-pakketti statistiċi.

L-analiżi tkompli billi ssir spezzjoni tat-terminu ta' interazzjoni sess x konċentrazzjoni fit-tabella ANOVA ([1]). Fin-nuqqas ta' terminu ta' interazzjoni sinifikanti, il-valuri kombinati bejn is-sessi jew fost il-livelli ta' konċentrazzjoni jipprovdu testijiet statistiċi validi bejn il-livelli bbażati fuq it-terminu tal-varjabbiltà tar-raggruppati fi ħdan il-grupp tal-ANOVA.

L-analiżi tkompli billi tagħmel partizzjoni bejn l-istima tal-varjabbiltà bejn il-konċentrazzjonijiet f'kuntrasti li jipprovdu għal test għal kuntrasti lineari u kwadratiċi tar-risponsi bejn il-livelli tal-konċentrazzjonijiet. Meta jkun hemm interazzjoni sinifikanti sess x konċentrazzjoni, tista' ssir partizzjoni ta' dan it-terminu f'kuntrasti ta' interazzjoni lineari x sess u kwadradiku x sess ukoll. Dawn it-termini jipprovdu testijiet ta' jekk ir-risponsi għall-konċentrazzjoni humiex paralleli għaż-żewġ sessi jew jekk hemmx rispons differenzjali bejn iż-żewġ sessi.

L-istima tal-varjabbiltà tal-miġburin fi ħdan il-grupp tista' tintuża sabiex tipprovdi testijiet bejn il-pari tad-differenza bejn il-medji. Dawn il-paraguni jistgħu jsiru bejn il-medji għaż-żewġ sessi u bejn il-medji għal-livell ta' konċentrazzjoni differenti bħal fil-każ tal-paraguni mal-livelli tal-kontroll negattiv. F'dawk il-każijiet li fihom ikun hemm interazzjoni sinifikanti, jistgħu jsiru paraguni bejn il-medji ta' konċentrazzjonijiet differenti fi ħdan sess jew bejn il-medji tas-sessi fl-istess konċentrazzjoni.

Referenzi

Hemm ħafna kotba dwar l-istatistika li jiddiskutu t-teorija, id-disinn, il-metodoloġija, l-analiżi u l-interpretazzjoni tad-disinni fattorjali li jvarjaw mill-iktar analiżijiet b'żewġ fatturi sempliċi sal-iktar forom kumplessi użati fil-metodoloġija dwar id-Disinn tal-Esperiment. Din li ġejja mhijiex lista eżawrjenti. Uħud mill-kotba jipprovdu eżempji maħdumin ta' disinni komparabbli, f'ċerti każijiet b'kodiċi għat-twettiq tal-analiżijiet bl-użu ta' diversi pakketti ta' softwer.

([1]) L-esperti tal-istatistika li jieħdu approċċ għall-immudellar bħal dak li juża Mudelli Lineari Ġenerali (GLMs) jistgħu jagħmlu l-analiżi b'mod differenti iżda paragunabbli iżda mhux bilfors inaddmu t-tabella ANOVA tradizzjonali, li tmur lura għal approċċi algoritmiċi tal-kalkolu tal-istatistiki żviluppati qabel il-miġja tal-kompjuters.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Appendiċi 3

LIMITAZZJONIJIET ATTWALI TAL-ASSAĠĠ

Minħabba l-istat attwali tal-għarfien, bosta limitazzjonijiet huma assoċjati mal-assaġġ kometa *in vivo*. Huwa mistenni li dawn il-limitazzjonijiet sejrin jonqsu jew jiġu definiti b'mod iktar speċifiku peress li hemm iktar esperjenza bl-applikazzjoni tal-assaġġ sabiex iwieġeb għal kwistjonijiet marbutin mas-sikurezza f'kuntest regolatorju.

1. Ċerti tipi ta' ħsara fid-DNA jistgħu jkunu qosra, jiġifieri jistgħu jissewwew malajr wisq sabiex jilħqu jiġu osservati 24 siegħa jew iktar wara l-aħħar doża. Ma hemm ebda lista identifikabbli tat-tipi ta' ħsarat qosra, u lanqas tas-sustanzi kimiċi li aktarx li jikkaġunaw dan it-tip ta' ħsara, u lanqas ma huwa magħruf kemm irid jgħaddi ħin sabiex ikun jista' jiġi individwat dan it-tip ta' ħsara. Il-ħin(ijiet) tal-kampjunar ottimali jista' jkun speċifiku għas-sustanza kimika jew għar-rotta u l-ħinijiet tal-kampjunar għadhom jiġu stabbiliti minn dejta kinetika (pereżempju l-ħin, T_{max}, li fih tinkiseb il-quċċata tal-plażma jew il-konċentrazzjoni fit-tessut), meta tkun teżisti t-tali dejta. Ħafna mill-istudji ta' validazzjoni li jsostnu dan il-metodu ta' ttestjar speċifikaw nekropsija sagħtejn jew tlieta wara l-amministrazzjoni tal-aħħar doża. Ħafna mill-istudji fit-tagħrif ippubblikat jiddeskrivu l-amministrazzjoni tal-aħħar doża bejn sagħtejn sa sitt sigħat qabel is-sagrifikar. Għaldaqstant, dawn l-esperjenzi ntużaw bħala l-bażi għar-rakkomandazzjoni fil-metodu ta' ttestjar li, fin-nuqqas ta' dejta li tindika xi ħaġa oħra, l-aħħar doża għandha tingħata f'punt ta' żmien speċifikat bejn sagħtejn u sitt sigħat wara n-nekropsija.

2. Ma hemm ebda dejta ta' studju identifikabbli li jeżaminaw is-sensittività tat-test għall-identifikazzjoni ta' ħsara qasira fid-DNA wara l-għoti fl-ikel jew l-ilma tax-xorb meta mqabbel mal-għoti b'gavage. Il-ħsara fid-DNA ġiet individwata wara l-għoti fl-għalf u l-ilma tax-xorb, iżda ftit li xejn hemm rapporti bħal dawn meta mqabblin mal-esperjenza ferm ikbar bil-gavage u l-għoti i.p. B'hekk, is-sensittività tal-assaġġ tista' titnaqqas għal sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara fil-qosor mogħtijin mal-ikel jew l-ilma tax-xorb.

3. Ma sar ebda studju bejn laboratorji f'tessuti apparti l-fwied u l-istonku, u għalhekk ma ġiet stabbilita ebda rakkomandazzjoni dwar kif jinkiseb rispons sensittiv u riproduċibbli f'tessuti apparti l-fwied, bħal meded tal-kontroll pożittiv u negattiv mistenni. Għall-fwied, lanqas ma seta' jintlaħaq qbil fuq l-issettjar ta' limitu inqas għall-valur tal-kontroll negattiv.

4. Għad li hemm bosta pubblikazzjonijiet li juru l-effett ta' konfużjoni taċ-ċitotossiċità *in vitro*, ftit li xejn ġiet ippubblikata dejta *in vivo* u għalhekk ma tista' tiġi rakkomandata ebda miżura waħedha taċ-ċitotossiċità. Bidliet istopatoloġiċi bħal infjammazzjoni, infiltrazzjoni taċ-ċelloli, bidliet apoptotiċi jew nekrotiċi ġew assoċjati ma' żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA, madankollu, kif muri mill-prova ta' validazzjoni tal-JaCVAM (OECD, 2014), dawn il-bidliet mhux dejjem jirriżultaw f'sejbiet tal-kometa pożittivi u, għaldaqstant, ma hemm ebda lista definittiva ta' bidliet istopatoloġiċi li dejjem ikunu assoċjati ma' migrazzjoni ikbar tad-DNA għad-dispożizzjoni. Fl-imgħoddi ġie ssuġġerit li qniefed (jew sħab, ċelloli fatati) huma indikatur ta' ċitotossiċità, madankollu, l-etjoloġija tal-qniefed mhijiex ċerta. Teżisti dejta li tissuġġerixxi li jistgħu jkunu kkaġunati minn ċitotossiċità relatata mas-sustanza kimika, ħsara mekkanika/indotta mill-enzimi mibdija matul it-tħejjija tal-kampjun (Guerard *et al*., 2014) u/jew effett iktar estrem tal-ġenotossiċità tas-sustanza kimika tat-test. Dejta oħra donnha turi li huma dovuti għal ħsara fid-DNA estensiva, iżda li forsi tista' tissewwa (Lorenzo *et al.*, 2013).

▼M7

5. It-tessuti jew nukleji taċ-ċelloli ġew iffriżati b'suċċess sabiex jiġu analizzati iktar tard. Normalment dan jirriżulta f'effett li jista' jitkejjel fuq ir-rispons għall-veikolu u l-kontroll pożittiv (Recio *et al.*, 2010; Recio at al., 2012; Jackson at al., 2013). Jekk jużahom, il-laboratorju għandu juri li huwa kompetenti fil-metodoloġiji tal-iffriżar u jikkonferma meded aċċettabbli baxxi tal- % tad-DNA tad-dnieb fit-tessuti fil-mira tal-annimali ttrattati bil-veikolu, u li għadhom jistgħu jiġu individwati risponsi pożittivi. Fit-tagħrif, l-iffriżar tat-tessuti ġie deskritt bl-użu ta' metodi differenti. Madankollu, bħalissa ma hemm ebda qbil fuq kif l-aħjar jiġu ffriżati u jitħallew jinħallu t-tessuti, u kif jiġi vvalutat jekk rispons potenzjalment alterat jista' jaffettwa s-sensittività tat-test.

6. Il-ħidma riċenti turi li l-lista ta' varjabbli kritika hija mistennija li tkompli tiqsar u li jkomplu jiġu definiti l-parametri għall-varjabbli kritiċi (Guerard *et al.*, 2014).

Referenzi

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

(3) Lorenzo, Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

(4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼M8

B.63. **TEST TA' SKRINJAR TAT-TOSSIĊITÀ RIPRODUTTIVA/TAL-IŻVILUPP**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 421 tal-OECD (2016). Il-linji gwida tal-OECD għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-linja gwida tat-test ta' skrinjar oriġinali 421 ġiet adottata fl-1995, fuq il-bażi ta' protokoll għal "Test ta' Skrinjar għat-Tossiċità Riproduttiva Preliminari" diskuss f'żewġ laqgħat ta' esperti, f'Londra fl-1990 (1) u f'Tokyo fl-1992 (2).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar ġie aġġornat b'punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali, bħala segwitu għall-attività ta' prijorità għolja mnedija fl-OECD fl-1998 biex jiġu riveduti l-linji gwida tat-test eżistenti u jiġu żviluppati linji gwida tat-test ġodda għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (3). Pereżempju, it-TG 407 tal-OECD (Studju dwar it-Tossiċità Orali fuq 28 Jum b'Doża Ripetuta fir-Rodituri, Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness) ġiet miżjuda fl-2008 b'parametri xierqa biex tiġi individwata l-attività endokrinali tas-sustanzi kimiċi tat-test. L-objettiv fl-aġġornar tat-TG 421 kien li jiġu inklużi xi punti ta' tmiem rilevanti ta' interferenti endokrinali fit-TGs tal-iskrinjar meta l-perjodi ta' esponiment ikopru wħud mill-perjodi sensittivi matul l-iżvilupp (perjodi ta' qabel it-twelid jew ta' kmieni wara t-twelid).

3. Il-punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali addizzjonali magħżula, li wkoll huma parti mit-TG 443 (Studju Estiż dwar it-Tossiċità Riproduttiva f'Ġenerazzjoni Waħda, Kapitolu B.56 ta' dan l-Anness), kienu inklużi fit-TG 421 fuq il-bażi ta' studju tal-fattibbiltà li jindirizza mistoqsijiet xjentifiċi u tekniċi relatati mal-inklużjoni tagħhom, kif ukoll adattamenti possibbli fid-disinn tat-test meħtieġa għall-inklużjoni tagħhom (4).

4. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jiġġenera informazzjoni limitata rigward l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq il-prestazzjoni riproduttiva fl-irġiel u fin-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u l-ħlas. Mhuwiex alternattiva għall-metodi ta' ttestjar eżistenti B.31, B.34, B.35 jew B.56 u lanqas ma jiħdilhom posthom.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

5. Dan il-metodu ta' ttestjar ta' skrinjar jista' jintuża biex jipprovdi informazzjoni inizjali dwar l-effetti possibbli fuq ir-riproduzzjoni u/jew l-iżvilupp, jew fi stadju bikri ta' valutazzjoni tal-proprjetajiet tossikoloġiċi tas-sustanzi kimiċi, jew fuq is-sustanzi kimiċi ta' thassib. Jista' jintuża wkoll bħala parti minn sett ta' testijiet ta' skrinjar inizjali għal sustanzi kimiċi tat-test eistenti li għalihom ftit li xejn ikun hemm informazzjoni tossikoloġika disponibbli jew l-ebda affattu, bħal studju ta' individwazzjoni tad-doża għal studji aktar estensivi dwar ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp, jew meta jitqies rilevanti b'xi mod ieħor. Fit-twettiq tal-istudju, għandhom jiġu segwiti l-prinċipji ta' gwida u l-kunsiderazzjonijiet spjegati fid-dokument ta' gwida nru 19 tal-OECD dwar ir-rikonoxximent, il-valutazzjoni, u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem umanitarji għal annimali sperimentali użati fl-evalwazzjonijiet tas-sikurezza (5).

▼**M8**

6. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni kompluta fuq l-aspetti kollha tar-riproduzzjoni u tal-iżvilupp. B'mod partikolari, dan joffri biss mezz limitat kif jiġu individwati l-manifestazzjonijiet ta' wara t-twelid ta' esponiment ta' qabel it-twelid, jew l-effetti li jistgħu jiġu indotti matul l-esponiment ta' wara t-twelid. Minħabba (fost raġunijiet oħra) in-numri relattivament żgħar ta' annimali fil-gruppi tad-doża, is-selettività tal-punti ta' tmiem, u d-durata qasira tal-istudju, dan il-metodu mhux se jipprovdi evidenza għal dikjarazzjonijiet definiti ta' ebda effett. Barra minn hekk, fin-nuqqas ta' *data* minn testijiet oħra dwar it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali.

7. Ir-riżultati miksubin mill-parametri relatati mas-sistema endokrinali għandhom jitqiesu fil-kuntest tal-"OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (6). F'dan il-Qafas Kunċettwali, it-TG 421 imtejba tal-OECD tinsab fil-livell 4 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti. Madankollu, sinjal endokrinali waħdu jaf ma jitqiesx evidenza suffiċjenti li s-sustanza kimika tat-test hi interferent endokrinali.

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jassumi amministrazzjoni orali tas-sustanza kimika tat-test. Jaf ikun hemm bżonn ta' modifiki jekk jintużaw rotot oħra ta' esponiment.

9. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

10. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Is-sustanza kimika tat-test tingħata f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' rġiel u nisa. L-irġiel għandhom jingħataw doża għal minimu ta' erba' ġimgħat u sal-jum ta' qabel il-qatla skedata (dan jinkludi minimu ta' ġimagħtejn qabel it-tgħammir, matul il-perjodu ta' tgħammir u, bejn wieħed u ieħor, ġimagħtejn wara t-tgħammir). Fid-dawl tal-perjodu ta' dożaġġ limitat ta' qabel it-tgħammir, il-fertilità jaf ma tkunx indikatur partikolarment sensittiv ta' tossiċità testikolari. Għaldaqstant, eżami istoloġiku dettaljat tat-testikoli hu essenzjali. Il-kombinazzjoni tal-perjodu ta' dożaġġ ta' qabel it-tgħammir ta' ġimagħtejn u l-osservazzjonijiet sussegwenti dwar it-tgħammir/il-fertilità b'perjodu ta' dożaġġ ġenerali ta' tal-anqas erba' ġimgħat, segwiti minn istopatoloġija dettaljata tal-gonadi tal-irġiel, hija meqjusa suffiċjenti biex tkun tista' tiġi individwata l-maġġoranza tal-effetti fuq il-fertilità u l-ispermatoġenesi tal-irġiel.

12. In-nisa għandhom jingħataw doża matul l-istudju kollu. Dan jinkludi ġimagħtejn qabel it-tgħammir (bl-objettiv li jkunu koperti tal-anqas żewġ ċikli estruż sħaħ), il-ħin varjabbli sal-konċepiment, id-durata tat-tqala u tal-anqas 13-il jum wara l-ħlas, sa u inkluż il-jum ta' qabel il-qatla skedata.

13. Id-durata tal-istudju, wara l-akklimatizzazzjoni u l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż ta' qabel id-dożaġġ, tiddependi mill-prestazzjoni tan-nisa u hi madwar 63 jum, [tal-anqas 14-il jum qabel it-tgħammir, (sa) 14-il jum tat-tgħammir, 22 jum tal-ġestazzjoni, 13-il jum tat-treddigħ].

▼M8

14. Matul il-perjodu ta’ amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib, kull jum għal sinjali ta’ tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul il-perjodu tat-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

15. Dan il-metodu ta’ ttestjar hu mfassal biex jintuża b’firien. Għandha tingħata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f’dan il-metodu ta’ ttestjar ikunu investigati fi speċijiet oħra ta’ rodituri. Fil-programm internazzjonali ta’ validazzjoni għad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali fit-TG 407 tal-OECD (li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta’ dan l-Anness), il-far kien l-unika speċi użata. Ma għandhomx jintużaw razez b’fekundità baxxa jew li huma magħrufa li għandhom inċidenza għolja ta’ difetti fl-iżvilupp. Għandhom ikunu użati annimali verġni f’saħħithom li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skont l-ispeċi, ir-razza, is-sess, il-piż u/jew l-età. Malli jinbeda l-istudju l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati għandha tkun minima u ma għandhiex taqbeż l-20 % tal-piż medju taż-żewġ sessi. Meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju fit-tul jew ta’ ġenerazzjoni sħiħa, idealment fiż-żewġ studji jintużaw annimali li jkunu mill-istess razza u sors.

Abitazzjoni u għalf

16. Il-proċeduri kollha għandhom ikunu konformi ma’ standards lokali tal-kura tal-annmali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun ta’ 22 °C (± 3 °). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun tal-anqas ta’ 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta’ 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, billi l-fotoperjodu jkun ta’ 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta’ ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista’ tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta’ sustanza kimika tat-test meta tingħata b’dan il-metodu.

17. L-annimali għandhom jitqiegħdu f’abitazzjoni fi gruppi żgħar tal-istess sess; l-annimali jistgħu jitqiegħdu f’abitazzjoni waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat. Għal gruppi f’gaġeġ, ma għandux ikun hemm aktar minn ħames annimali jabitaw f’gaġġa waħda. Il-proċeduri ta’ tgħammir għandhom jitwettqu f’gaġeġ adattati għall-iskop. In-nisa tqal għandhom jitqiegħdu fil-gaġeġ waħedhom u jiġu pprovduti b’materjali tat-tibjit. In-nisa li jkunu qed ireddgħu jitqiegħdu f’gaġeġ waħedhom mal-wild tagħhom.

18. L-għalf għandu jkun analizzat regolarment għall-kontaminanti. Għandu jinżamm kampjun tad-dieta sakemm ikun iffinalizzat ir-rapport.

Preparazzjoni tal-annimali

19. L-annimali adulti żgħażagħ f’saħħithom ikunu assenjati b’mod każwali lill-gruppi ta’ kontroll u ta’ trattament. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b’mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati unikament u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom tal-anqas għal ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

Preparazzjoni tad-doża

20. Hu rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tingħata b’mod orali sakemm rotot oħra ta’ amministazzjoni ma jitqisux aktar xierqa. Meta tingħażel ir-rotta orali, is-sustanza kimika tat-test normalment tingħata b’gavage; madankollu, f’każijiet oħra, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb.

▼M8

21. Meta jkun hemm bżonn, is-sustanza kimika tat-test tinħall jew tiġi sospiża f'veikolu xieraq. Hu rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, segwit minn kunsiderazzjoni ta' soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'veikoli oħra. Għal veikoli li mhumiex ilma, għandhom ikunu magħrufin il-karatteristiċi tossiċi tal-veikolu. Għandhom jiġu ddeterminati l-istabbiltà u l-omoġenità tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu.

PROĊEDURA

Numru u Sess tal-annimali

22. Hu rakkomandat li kull grupp jinbeda b'tal-anqas 10 irġiel u 12-13-il mara. In-nisa jiġu evalwati qabel l-esponiment għaċ-ċikliċità estruża u l-annimali li ma jurux ċikli tipiċi ta' bejn erba' u ħamest ijiem ma jiddaħħlux fl-istudju; għaldaqstant, huma rakkomandati nisa żejda biex jinkisbu 10 nisa għal kull grupp. Ħlief fil-każ ta' effetti tossiċi ċari, hu mistenni li dan jipprovdi tal-anqas tmien nisa tqal għal kull grupp li normalment ikun in-numru minimu aċċettabbli ta' nisa tqal għal kull grupp. L-objettiv hu li jiġu prodotti biżżejjed nisa tqal u wlied biex tkun żgurata evalwazzjoni sinifikattiva tal-potenzjal tas-sustanza kimika tat-test biex taffettwa l-fertilità, it-tqala, l-imġiba materna u tat-treddigħ, u t-tkabbir u l-iżvilupp tal-ulied F_1, mill-konċepiment sa 13-il jum wara l-ħlas.

Dożaġġ

23. Ġeneralment tal-anqas għandhom jintużaw tliet gruppi għat-test u grupp ta' kontroll. Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq informazzjoni minn testijiet tat-tossiċità akuta jew fuq riżultati minn studji dwar doża ripetuta. Ħlief għat-trattament bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu għall-amministrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat.

24. Il-livelli tad-doża għandhom jintgħażlu b'kunsiderazzjoni ta' kwalunkwe *data* eżistenti disponibbli dwar it-tossiċità u l-kinetika (jew it-tossikokinetika). Ta' min iqis ukoll li jista' jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u annimali mhux tqal. L-ogħla livell ta' doża għandu jintgħażel bl-għan li jġib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija severa. Wara, għandha tingħażel sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża bl-għan li jintwerew kwalunkwe reazzjoni relatata mad-dożaġġ u l-livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) fl-anqas livell tad-doża. Intervalli ta' darbtejn jew ta' erba' darbiet ta' spiss ikunu l-aħjar biex ikunu stabbiliti l-livelli neżlin tad-doži, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test sikwit spiss tkun preferibbli milli jintużaw intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

25. Meta jkun hemm tossiċità ġenerali osservata (eż. piż tal-ġisem imnaqqas, effetti tal-fwied, qalb, pulmun jew kliewi, eċċ.) jew tibdiliet oħra li jistgħu ma jkunux risponsi tossiċi (eż. konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensittivi endokrinali għandhom ikunu interpretati b'kawtela.

Test tal-limitu

26. Jekk studju orali b'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum jew, għall-amministrazzjoni tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, ta' perċentwali ekwivalenti fid-dieta jew ta' ilma tax-xorb, billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi osservabbli u jekk ma tkunx mistennija tossiċità bbażata fuq *data* minn sustanzi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju sħiħ bl-użu ta' diversi livelli ta' doża jista' ma jitqiesx li jkun meħtieġ. It-test tal-limitu hu applikabbli apparti minn meta l-eposizzjoni umana tindika il-ħtieġa għal doża orali għola fil-livell użat. Għal tipi oħrajn ta' amministrazzjoni, bħal ma hi l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, bħal kemm tinħall, ta' spiss jistgħu jiddettaw il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb.

▼M8

Amministrazzjoni tad-doża

27. L-annimali jingħataw doża tas-sustanza kimika tat-test darba kuljum għal sebat ijiem fil-ġimgħa. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata b'gavage, dan għandu jsir b'doża singola lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Ħlief għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

28. Għas-sustanzi kimiċi tat-test mogħtija permezz tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza kimika tat-test involuti ma jxekklux in-nutrizzjoni jew il-bilanċ tal-ilma normali. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal sustanza amministrata b'gavage, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili ta' kull jum, u tiġi aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa biex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal.

Skeda sperimentali

29. Id-dożaġġ taż-żewġ sessi għandu jibda tal-anqas ġimagħtejn (2) qabel it-tgħammir, wara li jkunu ħallew iderru għal tal-anqas ħamest ijiem u n-nisa jkunu ġew skrinjati għaċ-ċikli estruż normali (f'perjodu ta' pretrattament ta' ġimagħtejn). L-istudju għandu jkun skedat b'tali mod li l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż tibda ftit wara li l-annimali jkunu kisbu maturità sesswali sħiħa. Dan jista' jvarja ftit għal razez differenti ta' firien f'laboratorji differenti, eż. firien Sprague Dawley ta' 10 ġimgħat, firien Wistar li jkollhom madwar 12-il ġimgħa. L-ommijiet b'wild għandhom jinqatlu fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara. Il-jum tat-twellid (meta jitlesta l-ħlas) hu definit bħala l-jum 0 wara l-ħlas. In-nisa li ma juru ebda evidenza ta' tgħammir jinqatlu 24-26 jum wara l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir. Id-dożaġġ jissokta għaż-żewġ sessi matul il-perjodu ta' tgħammir. L-irġiel għandhom jibqgħu jingħataw id-doża wara l-perjodu ta' tgħammir tal-anqas sakemm jitlesta l-perjodu minimu totali ta' dożaġġ ta' 28 jum. Imbagħad dawn jinqatlu jew inkella jinżammu u jibqgħu jingħataw id-doża għat-twettiq possibbli tat-tieni faża ta' tgħammir jekk jitqies li din tkun xierqa.

30. Id-dożaġġ ta' kuljum tan-nisa ommijiet għandu jkompli matul it-tqala u tal-anqas sal-jum 13 wara l-ħlas, b'dan il-jum inkluż, jew sal-jum ta' qabel is-sagrifiċċju. Għall-istudji li fihom is-sustanza kimika tat-test tingħata bit-teħid man-nifs jew bir-rotta dermali, id-dożaġġ għandu jkompli tal-anqas sal-jum 19 tal-ġestazzjoni, b'dan il-jum inkluż, u d-dożaġġ għandu jerġa' jinbeda mill-aktar fis possibbli u mhux aktar tard mill-PND 4.

31. Dijagramma tal-iskeda sperimentali hi mogħtija fl-Appendiċi 2.

Priċedura tat-tgħammir

32. Normalment, f'dan l-istudju għandu jsir tgħammir 1:1 (raġel wieħed ma' mara waħda). Jista' jkun hemm eċċezzjonijiet f'każ ta' mwiet okkażjonali tal-irġiel. Il-mara għandha titqiegħed mal-istess raġel sakemm tiġi osservata evidenza ta' tgħammir jew ikunu għaddew ġimagħtejn. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tapp vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala hu definit bħala l-jum li fih tiġi kkonfermata evidenza ta' tgħammir (jinstabu tapp vaġinali jew sperma). Fil-każ li l-par ma jirnexxix, jista' jiġi kkunsidrat it-tgħammir mill-ġdid ta' nisa ma' rġiel diġa ipprovati tal-istess grupp.

▼M8

Daqs tal-boton

33. Fil-jum 4 wara t-twelid, id-daqs ta' kull boton jista' jiġi aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda b'għażla aleatorja biex jitrendew, l-aktar viċin possibbli, erba' jew ħamest ifrieħ għal kull sess għal kull boton skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użata. Il-kampjuni tad-demm għandhom jinġabru minn tnejn mill-frieħ eċċessi, jiġu raggruppati, u jintużaw għad-determinazzjoni tal-livelli tas-serum T4. Ma għandhiex issir eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż. fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem, jew tad-distanza anoġenitali (AGD). Mull meta n-numru ta' frieħ irġiel jew nisa jipprevjeni milli jkun hemm erbgħa jew ħamsa minn kull sess għal kull boton, hu aċċettabbli li jsir aġġustament parzjali (pereżempju, sitt irġiel u erba' nisa). Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas mill-mira tal-qtil (8 jew 10 ferħ/boton). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mill-mira tal-qtil, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

34. Jekk id-daqs tal-boton ma jkunx aġġustat, żewġt ifrieħ għal kull boton jiġu sagrifikati fil-jum 4 wara t-twelid u jittieħdu l-kampjuni tad-demm għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal-ormon tat-tirojde tas-serum. Jekk possibbli, iż-żewġt ifrieħ għal kull boton għandhom ikunu frieħ nisa biex il-frieħ irġiel jinżammu għall-evalwazzjonijiet taż-żamma tal-beżżula ħlief fil-każ li jekk jitneħħew dawn il-frieħ ma jifdal ebda nisa għall-valutazzjoni fit-terminazzjoni. Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas minn 8 jew 10 ifrieħ/boton (skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użati). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mid-daqs normali tal-boton, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

Osservazzjonijiet fil-ħajja

Osservazzjonijiet kliniċi

35. Matul il-perjodu tat-test, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali tal-anqas darba kuljum, u aktar spiss meta jiġu osservati sinjali ta' tossiċità. Idealment dawn għandhom isiru fl-istess ħin kuljum, b'kunsiderazzjoni tal-perjodu bl-ogħla livell ta' effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Tibdil relevanti fl-imġiba, sinjali ta' diffikultà jew titwil tal-proċess tal-ħlas u kull sinjal ta' tossiċità, inkluża l-mortalità, għandhom ikunu irreġistrati. Dawn ir-rekords għandhom jinkludu l-ħin tal-bidu, il-grad u d-durata tas-sinjali ta' tossiċità.

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel/ilma

36. L-irġiel u n-nisa għandhom jintiżnu fl-ewwel jum tad-dożaġġ, tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, u fit-terminazzjoni. Matul it-tqala, in-nisa għandhom jintiżnu fil-jiem 0, 7, 14 u 20 u fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom ikunu rapportati individwalment għal kull annimal adult.

37. Matul il-fażi ta' qabel it-tgħammir, it-tqala u t-treddigħ, il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel tal-anqas darba fil-ġimgħa. Il-kejl tal-konsum tal-ikel matul it-tgħammir hu fakultattiv. Il-konsum tal-ikel matul dawn il-perjodi għandu jitkejjel ukoll meta s-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb.

Ċikli estruż

38. Iċ-ċikli estruż għandhom jiġu ssorveljati qabel ma jibda t-trattament biex għall-istudju jintgħażlu nisa b'ċikliċità regolari (ara l-paragrafu 22). It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu ssorveljati ta' kuljum ukoll mill-bidu tal-perjodu ta' trattament sal-evidenza ta' tgħammir. Jekk ikun hemm tħassib

▼M8

dwar effetti akuti ta' stress li jistgħu jbiddlu ċ-ċikli estrużi bit-tnedija tad-dożaġġ, il-laboratorji jistgħu jesponu l-annimali tat-test għal ġimagħtejn (2), imbagħad jiġbru tiċpisiet vaġinali ta' kuljum biex jissorveljaw iċ-ċiklu estruż għal minimu ta' ġimagħtejn matul il-perjodu ta' qabel it-tgħammir b'monitoraġġ issoktat fil-perjodu ta' tgħammir sakemm ikun hemm evidenza ta' tgħammir. Meta jinkisbu ċelloli vaġinali/ċervikali, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tfixkil tal-mukoża, li jista' jinduċi psewdotqala (7) (8).

Parametri tal-ulied

39. Id-durata tal-ġestazzjoni għandha tiġi reġistrata u hi kkalkolata mill-jum 0 tat-tqala. Kull boton għandu jiġi eżaminat mill-aktar fis possibbli wara l-ħlas biex jiġu stabbiliti n-numru u s-sess tal-frieħ, it-twelid mejjet, it-twelid ħaj, it-twelid mhux żviluppat (frieħ li jkunu ferm iżgħar mill-frieħ tal-kontroll korrispondenti) u l-preżenza ta' anormalitajiet serji.

40. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jitqassmu skont is-sess u kull boton għandu jintiżen fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Minbarra l-osservazzjonijiet deskritti fil-paragrafu 35, kwalunkwe mġiba anormali tal-wild għandha tiġi reġistrata.

41. L-AGD ta' kull ferħ għandha titkejjel fl-istess jum postnatali bejn il-PND 0 sal-PND 4. Il-piż tal-ġisem tal-frieħ għandu jingħabar dakinhar li titkejjel l-AGD u l-AGD għandha tiġi normalizzata għal kejl tad-daqs tal-ferħ, idealment l-għerq kwadrat tal-piż tal-ġisem (9). In-numru ta' bżieżel/areoli fil-frieħ irġiel għandu jingħadd fil-PND 12 jew 13 kif rakkomandat fil-GD 151 tal-OECD (10).

Bijokimika klinika

42. Il-kampjuni tad-demm minn sit definit jittieħdu fuq il-bażi tal-iskeda li ġejja:

— minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fil-jum 4 wara t-twelid, jekk in-numru ta' frieħ jippermetti (ara l-paragrafi 33-34)

— mill-ommijiet kollha u minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fit-terminazzjoni fil-jum 13, u

— mill-irġiel adulti kollha, fit-terminazzjoni,

Il-kampjuni kollha tad-demm jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Kampjuni tad-demm mill-frieħ tal-jum 13 u mill-irġiel adulti jiġu vvalutati għal-livelli tas-serum għall-ormoni tat-tirojde (T4). Issir valutazzjoni ulterjuri tat-T4 fil-kampjuni tad-demm għall-ommijiet u għall-frieħ tal-jum 4 jekk tkun rilevanti. Hemm l-għażla li jistgħu jitkejlu ormoni oħra jekk ikunu rilevanti. Id-demm tal-frieħ jista' jiġi raggruppat skont il-boton għall-analiżijiet tal-ormon tat-tirojde. L-ormoni tat-tirojde (T4 u TSH) idealment għandhom jitkejlu bħala "total".

43. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-konċentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:

— il-ħin tal-qatla minħabba varjazzjonijiet tul il-jum tal-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— il-metodu tal-qatla biex tkun evitata tensjoni bla bżonn għall-annimali li tista' taffettwa l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— is-settijiet tat-testijiet għad-determinazzjonijiet tal-ormoni li jistgħu jkunu differenti mill-kurvi standard tagħhom.

▼M8

44. Kampjuni ta’ plażma maħsubin speċifikatament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f’ħin komparabbli tal-jum. Il-valuri numeriċi miksubin meta jkunu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta’ analiżi kummerċjali.

Patoloġija

Nekroskopija grossa

45. Fil-waqt tas-sagrifiċċju jew tal-mewt matul l-istudju, l-annimali adulti għandhom jiġu eżaminati makroskopikament għal kwalunkwe anormalità jew tibdil patoloġiku. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-organi tas-sistema riproduttiva. In-numru ta’ siti ta’ impjantazzjoni għandu jiġi reġistrat. It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu eżaminati filgħodu dakinhar tan-nekroskopija biex jiġi determinat l-istadju taċ-ċiklu estruż u tkun tista’ ssir korrelazzjoni mal-istopatoloġija tal-ovarji.

46. It-testikoli u l-epididimidi kif ukoll il-bżieżaq tal-prostata u seminali bil-glandoli koagolanti fis-sħuħija tagħhom, tal-annimali adulti rġiel kollha għandhom jiġu mirquma minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u l-piż niedi tagħhom għandu jittieħed mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. Barra minn hekk, il-pożijiet tal-organi fakultattivi jistgħu jinkludu l-kumpless tal-levator ani u tal-muskolu bulbokavernuż, il-glandoli ta’ Cowper u r-ras tal-pene fl-irġiel u l-ovarji f’pari (piż imxarrab) u l-utru (inkluż iċ-ċerviċi) fin-nisa; jekk inklużi, dawn il-pożijiet għandhom jinġabru mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni.

47. Frieħ mejtin u frieħ maqtula fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara, tal-anqas għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa esternament għal anormalitajiet serji. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-ġenitali riproduttivi esterni li għandhom jiġu eżaminati għal sinjali ta’ żvilupp mibdul. Fil-jum 13, għandha tiġi preservata t-tirojde minn ferħ raġel wieħed u minn ferħ mara waħda għal kull boton.

48. L-ovarji, it-testikoli, l-organi sesswali aċċessorji (utru u ċerviċi, epididimidu, prostata, bużżieqa seminali u l-glandoli koagolanti), it-tirojde u l-organi kollha li juru leżjonijiet makroskopiċi tal-annimali adulti kollha għandhom jiġu preservati. Il-fissazzjoni formalina mhix rakkomandata għall-eżaminazzjoni ta’ rutina tat-testikoli u tal-epididimidu. Metodu aċċettabbli hu l-użu tal-fissattiv ta’ Bouin jew ta’ Davidsons modifikat għal dawn it-tessuti (11). It-tunika albuġinea tista’ tittaqqab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b’labra biex jitħalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv.

Istopatoloġija

49. Għandu jsir eżami istoloġiku dettaljat fuq l-ovarji, it-testikoli u l-epididimide (b’enfasi speċjali fuq l-istadji tal-ispermatoġenesi u l-istopatoloġija tal-istruttura ċellolari testikolari interstizjali) tal-annimali tal-grupp tal-ogħla doża u tal-grupp tal-kontroll. L-organi preservati l-oħra inkluża t-tirojde mill-frieħ u mill-annimali adulti jistgħu jiġu eżaminati meta jkun hemm bżonn. Il-piż tat-tirojde jista’ jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirqim għandu jsir ukol b’reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-ħsara lit-tessut. Il-ħsara fit-tessut tista’ tippreġudika analiżi istopatoloġika. L-eżaminazzjonijiet għandhom ikunu estiżi għall-annimali tal-gruppi l-oħra ta’ dożaġġ meta jkunu osservati tibdiliet fil-grupp tal-ogħla doża. Il-Gwida dwar l-istopatoloġija (11) tagħti aktar informazzjoni dwar id-dissezzjoni, fissazzjoni, tqassim f’taqsimiet u l-istopatoloġija ta’ tessuti endokrinali.

▼M8

DATA U RAPPORTAR

Data

50. Għandha tkun ipprovduta d-*data* dwar l-annimali individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tingħabar f'forma tabulari, u għal kull grupp tat-test għandha turi n-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew qtil uman, in-numru ta' annimali fertili, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inklużi l-ħin tal-ewwel darba, id-durata, u s-severità ta' kwalunkwe effett tossiku, it-tip ta' tibdiliet istopatoloġiċi u d-*data* rilevanti kollha dwar il-boton. Format tabulari tar-rapport ta' sommarju li wera li hu tassew siewi għall-evalwazzjoni tal-effett riproduttiv/tal-iżvilupp hu mogħti fl-Appendiċi 3.

51. Minħabba d-dimensjonijiet limitati tal-istudju, l-analiżijiet statistiċi fil-forma ta' testijiet għal "sinifikat" huma ta' valur limitat għal ħafna punti ta' tmiem, speċjalment il-punti ta' tmiem riproduttivi. Jekk jintużaw analiżijiet statistiċi, il-metodu magħżul għandu jkun xieraq għad-distribuzzjoni tal-varjabbli eżaminat, u jintgħażel qabel il-bidu tal-istudju. Analiżi statistika tal-AGD u taż-żamma tal-beżżula għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tal-effetti fuq il-boton. Fejn xieraq, il-boton hu l-unità ta' analiżi. Analiżi statistika tal-piż tal-ġisem tal-frieħ għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tad-daqs tal-boton. Minħabba d-daqs żgħir tal-grupp, l-użu ta' *data* storika tal-kontroll (eż. għad-daqs tal-boton), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.

Evalwazzjoni tar-riżultati

52. Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossiċità għandhom jiġu evalwati f'termini tal-effetti osservati, tan-nekroskopija u tas-sejbiet mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni bejn id-doża u s-sustanza kimika tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità tal-annormalitajiet, inklużi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, l-infertilità, l-anormalitajiet kliniċi, l-imġiba tar-riproduzzjoni u l-boton affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħra.

53. Minħabba l-perjodu qasir ta' trattament tal-irġiel, l-istopatoloġija tat-testikoli u tal-epididimu għandha tiġi kkunsidrata flimkien mad-*data* dwar il-fertilità meta jiġu vvalutati l-effetti riproduttivi fuq l-irġiel. L-użu ta' *data* storika tal-kontroll fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp (eż. għad-daqs tal-boton, l-AGD, iż-żamma tal-beżżula, il-livelli tas-serum T4), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.

54. Għall-kontroll tal-kwalità hu propost li tingħabar *data* storika ta' kontroll u li għad-*data* numerika jkunu kkalkolati l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni, speċjalment għall-parametri li jkollhom rabta mad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali. Din id-*data* tista' tintuża għal finijiet ta' paragun meta jkunu evalwati studji attwali.

Rapport tat-test

55. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

▼**M8**

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Veikolu (jekk xieraq):

— ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu jekk mhuwiex ilma.

L-annimali tat-test:

— speċi/razza użata;

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

— ġustifikazzjoni għal speċi jekk ma jkunx far

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/il-preparazzjoni tad-dieta, il-konċentrazzjonijiet, l-istabbiltà u l-omoġenità miksubin tal-preparazzjoni;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— konverżjoni minn dieta/konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura ta' każwalizzazzjoni biex jintgħażlu l-frieħ għall-qtil, jekk jinqatlu.

Ir-riżultati:

— il-piż tal-ġisem/it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem;

— il-konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk disponibbli;

— id-*data* dwar ir-rispons tossiku skont is-sess u d-doża, inklużi l-fertilità, il-ġestazzjoni u kwalunkwe sinjal ieħor ta' tossiċità;

— it-tul tal-ġestazzjoni;

— l-effetti tossiċi jew oħra fuq ir-riproduzzjoni, l-ulied, it-tkabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;

— in-natura, is-severità u d-durata tal-osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);

— in-numru ta' nisa adulti b'ċiklu estruż normali jew anormali u d-durata taċ-ċiklu;

— in-numru ta' twelid ħaj u ta' telf ta' wara l-impjantazzjoni;

— id-*data* dwar il-piż tal-ġisem tal-frieħ

— l-AGD tal-frieħ kollha (u l-piż tal-ġisem fl-jum tal-kejl tal-AGD)

▼M8

— iż-żamma tal-beżżula fil-frieħ irġiel,

— il-livelli tal-ormon tat-tirojde, il-frieħ tal-jum 13 u l-irġiel adulti (u l-ommijiet u l-frieħ tal-jum 4 jekk jitkejlu)

— in-numru ta' frieħ b'anormalitajiet viżibbli ċari, evalwazzjoni grossa tal-ġenitali esterni, in-numru ta' frieħ imwielda żgħar;

— il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqgħu ħajjin fit-terminazzjoni tat-test;

— in-numru ta' impjantazzjonijiet, id-daqs tal-boton u l-piżijiet tal-boton fil-ħin tar-reġistrazzjoni;

— il-piż tal-ġisem fis-sagrifiċċju u d-*data* dwar il-piż tal-organi għall-annimali ġenituri;

— sejbiet tan-nekroskopija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi;

— id-dettalji tal-assorbiment (jekk disponibbli);

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn xieraq.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

Interpretazzjoni tar-riżultati

56. L-istudju jipprovdi evalwazzjonijiet tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp assoċjata mal-amministrazzjoni ta' dożi ripetuti (ara l-paragrafi 5 u 6). Jista' jipprovdi indikazzjoni tal-ħtieġa li jsiru investigazzjonijiet ulterjuri u jipprovdi gwida fit-tfassil tal-istudji sussegwenti. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 għandu jiġi kkonsultat għal għajnuna fl-interpetazzjoni tar-riżultati dwar ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp (12). Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 106 dwar l-Evalwazzjoni Istoloġika tat-Testijiet Endokrinali u Riproduttivi fir-Rodituri (11) jipprovdi informazzjoni dwar it-tħejjija u l-evalwazzjoni tal-organi (endokrinali) u tat-tiċpisiet vaġinali li jistgħu jkunu ta' għajnuna għal din it-TG.

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (1990). Dokument tas-seduta Nru 1 għall-14-il Laqgħa Konġunta tal-Chemicals Group and Management Committee. Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) OECD (1992). Ir-Rapport tal-President tal-Laqgħa ta' Esperti *ad hoc* dwar il-Metodi ta' Skrinjar tat-Tossiċità Riproduttiva, Tokyo, 27-29 ta' Ottubru, 1992. Disponibbli Fuq Talba Mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(3) OECD (1998). Rapport tal-Ewwel Laqgħa tat-Task Force tal-OECD dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (EDTA), 10-11 ta' Marzu 1998. Disponibbli Fuq Talba Mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼**M8**

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. u Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Parti B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, f'Auston C.R. u Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. u Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼**M8**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET (ARA WKOLL IL-GD 150 TAL-OECD (6))

Androġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T3) f'organiżmu mammiferu.

Sustanza kimika hi sustanza jew taħlita.

Tossiċità tal-iżvilupp: il-manifestazzjoni tat-tossiċità riproduttiva, li tirrappreżenta disturbi strutturali jew funzjonali prenatali, perinatali u postnatali fil-wild.

Dożaġġ hi terminu ġenerali li jinvolvi d-doża, il-frekwenza tagħha u d-durata tad-dożaġġ.

Doża hi l-ammont ta' sustanza kimika tat-test mogħtija. Id-doża hi espressa bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità ta' piż tal-ġisem ta' annimal tat-test għal kull jum (eż. mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jew bħala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Tossiċità evidenti hi terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun ġiet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu u għandhom ikunu tali li żieda fid-doża amministrata tista' tkun mistennija li tirriżulta fl-iżvilupp ta' sinjali ta' tossiċità estrema u probabbilment mortalità.

Indeboliment tal-fertilità tirrappreżenta disturbi tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel jew tan-nisa.

Tossiċità materna: effetti avversi fuq nisa tqal, li jseħħu b'mod speċifiku (effett dirett) jew mhux speċifiku (effett indirett).

NOAEL hi l-abbrevjazzjoni għal-livell bla effett ħażin osservat. Dan hu l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet ħżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minħabba trattament.

Estroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Tossiċità riproduttiva tirrappreżenta l-effetti dannużi fuq il-wild u/jew indeboliment tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel u tan-nisa.

Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

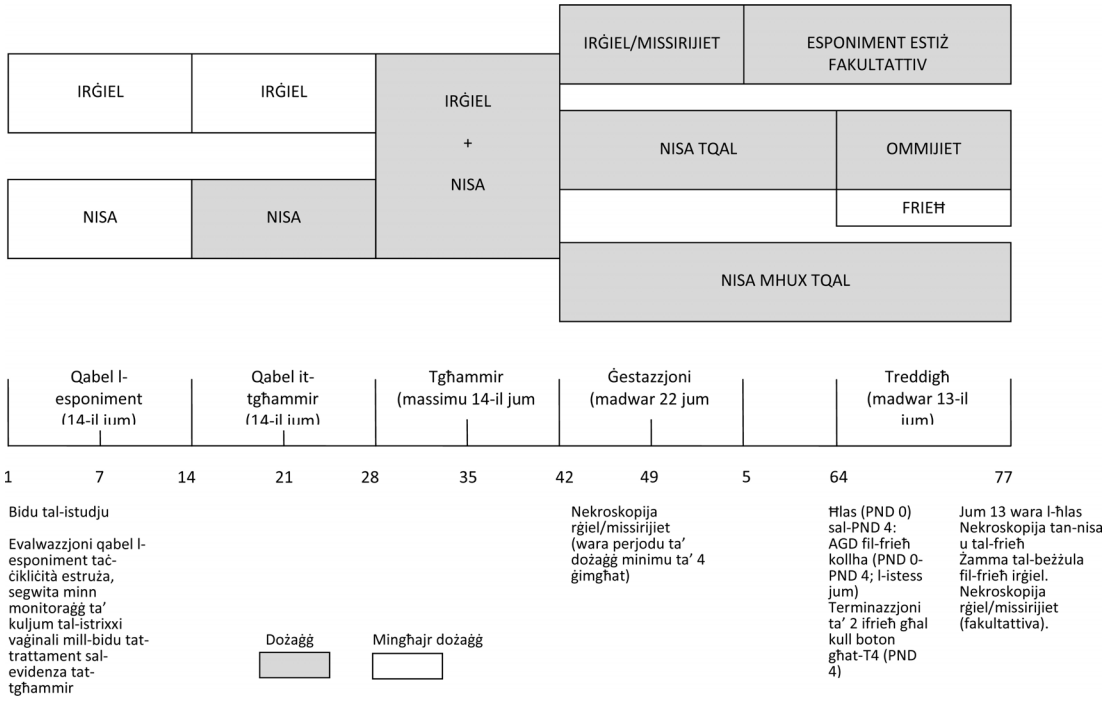
Attività tat-tirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon naturali tat-tirojde (eż. $T_{3)}$ f'organiżmu mammiferu.

Validazzjoni hi proċess xjentifiku mfassal biex jiġu karatterizzati r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex tintwera l-affidabbiltà u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

▼**M8**

Appendiċi 2

DIJAGRAMMA TAL-ISKEDA SPERIMENTALI LI TINDIKA D-DURATA MASSIMA TAL-ISTUDJU, FUQ IL-BAŻI TA' PERJODU SĦIĦ TA' TGĦAMMIR FUQ 14-IL JUM



▼**M8**

Appendiċi 3

RAPPORT SOMMARJU TABULARI TAL-EFFETTI FUQ IR-RIPRODUZZJONI/L-IŻVILUPP

OSSERVAZZJONIJIET	Valuri				
Dożaġġ (unitajiet)	0 (kontroll)	—	—	—	—
Pari mibdija (N)					
Ċiklu estruż (tal-anqas it-tul medju u l-frekwenza taċ-ċikli irregolari)					
Nisa li juru evidenza ta' tgħammir (N)					
Nisa li jilħqu t-tqala (N)					
Jiem tal-konċepiment 1 - 5 (N)					
Jiem tal-konċepiment 6 -...[1] (N)					
Tqala ≤ 21 jum (N)					
Tqala = 22 jum (N)					
Tqala ≥ 23 jum (N)					
Ommijiet b'żgħar ħajjin imwielda (N)					
Ommijiet b'żgħar ħajjin imwielda fil-jum 4 pp (N)					
Impjanti/omm (medja)					
Frieħ ħajjin/omm fil-ħlas (medja)					
Frieħ ħajjin/omm fil-jum 4 (medja)					
Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-ħlas (medja)					
Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-boton fil-ħlas (medja)					
Piż tal-boton fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-frieħ fil-ħlas (medja)					
Piż tal-frieħ fil-ħin tal-kejl tal-AGD (medja tal-irġiel, medja tan-nisa)					

▼M8

OSSERVAZZJONIJIET	Valuri				
Dożaġġ (unitajiet)	0 (kontroll)	—	—	—	—
AGD tal-frieħ fl-istess jum wara t-twelid, fil-ħlas – fil-jum 4 (medja tal-irġiel, medja tan-nisa, nota tal-PND)					
Piż tal-frieħ fil-jum 4 (medja)					
Żamma tal-beżżula tal-frieħ irġiel fil-jum 13 (medja)					
Piż tal-frieħ fil-jum 13 (medja)					
FRIEĦ ANORMALI					
Ommijiet b'0					
Ommijiet b'1					
Ommijiet bi ≥ 2					
TELF TAL-ULIED					
Impjantazzjonijiet qabel/wara t-twelid (impjantazzjonijiet nieqes it-twelid ħaj)					
Nisa b'0					
Nisa b'1					
Nisa bi 2					
Nisa bi ≥ 3					
Wara t-twelid (twelid ħaj nieqes il-ħajjin fil-jum 13 wara t-twelid)					
Nisa b'0					
Nisa b'1					
Nisa b'2					
Nisa bi ≥ 3					

([1]) l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir

▼M8

B.64 **STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ B'DOŻA RIPETUTA KOMBINAT MAT- TEST TA SKRINJAR TAT-TOSSIĊITÀ RIPRODUTTIVA/ TAL-IŻVILUPP**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 422 tal-OECD (2016). Il-linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-linja gwida tat-test ta' skrinjar oriġinali 422 ġiet adottata fl-1996, fuq il-bażi ta' protokoll għal "Doża Ripetuta Kombinata u Test ta' Skrinjar Riproduttiv/tal-Iżvilupp" diskuss f'żewġ laqgħat ta' esperti, f'Londra fl-1990 (1) u f'Tokyo fl-1992 (2).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jgħaqqad parti tal-iskrinjar tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp li hi bbażata fuq l-esperjenza miksuba fil-Pajjiżi membri mill-użu tal-metodu oriġinali fuq sustanzi kimiċi eżistenti b'volum ta' produzzjoni għoli u f'testijiet esploratorji b'sustanzi tal-kontroll pożittiv (3) (4), u parti tat-tossiċità b'doża ripetuta, b'mod konkordat mal-linja gwida tat-test 407 tal-OECD (Studju dwar it-Tossiċità Orali fuq 28 Jum b'Doża Ripetuta, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar ġie aġġornat b'punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali, bħala segwitu għall-attività ta' prijorità għolja mnedija fl-OECD fl-1998 biex jiġu riveduti l-linji gwida tat-test eżistenti u jiġu żviluppati linji gwida tat-test ġodda għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (5). F'dan il-kuntest, it-TG 407 (li jikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness) issaħħet fl-2008 b'parametri xierqa għall-individwar tal-attività endokrinali tas-sustanzi kimiċi tat-test. L-objettiv fl-aġġornar tat-TG 422 kien li jiġu inklużi xi punti ta' tmiem rilevanti ta' interferenti endokrinali fit-TGs tal-iskrinjar meta l-perjodi ta' esponiment ikopru wħud mill-perjodi sensittivi matul l-iżvilupp (perjodi ta' qabel it-twelid jew ta' kmieni wara t-twelid).

4. Il-punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali addizzjonali magħżula, li wkoll huma parti mit-TG 443 (Studju Estiż dwar it-Tossiċità Riproduttiva f'Ġenerazzjoni Waħda, li jikkorrispondi għall-Kapitolu B.56 ta' dan l-Anness), kienu inklużi fit-TG 422 fuq il-bażi ta' studju tal-fattibbiltà li jindirizza mistoqsijiet xjentifiċi u tekniċi relatati mal-inklużjoni tagħhom, kif ukoll adattamenti possibbli fid-disinn tat-test meħtieġa għall-inklużjoni tagħhom (6).

5. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jiġġenera informazzjoni limitata rigward l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq il-prestazzjoni riproduttiva fl-irġiel u fin-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u l-ħlas. Mhuwiex alternattiva għall-metodi ta' ttestjar eżistenti B.31, B.34, B.35 jew B.56 u lanqas ma jiħdilhom posthom.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

6. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' sustanza kimika tat-test, id-determinazzjoni ta' tossiċità orali bl-użu ta' dożi ripetuti tista' ssir wara li tkun inkisbet l-informazzjoni inizjali dwar it-tossiċità bl-ittestjar akut. Dan l-istudju jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli possibbli għas-saħħa li aktarx li jirriżultaw minn esponiment ripetut fuq perjodu relattivament limitat ta' żmien. Il-metodu jinkludi l-istudju dwar id-doża bażika ripetuta ta' tossiċità li jista' jintuża għal kimiċi li dwarhom ma jkunx jista' jsir studju ta' 90 jum (eż. meta l-volum tal-produzzjoni ma jkunx jeċċedi ċerti limiti) jew bħala studju preliminari għal studju fit-tul. Fit-twettiq tal-istudju, għandhom jiġu segwiti l-prinċipji ta' gwida u l-kunsiderazzjonijiet spjegati fid-dokument ta' gwida nru 19 tal-OECD dwar ir-rikonoxximent, il-valutazzjoni, u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem umanitarji għal annimali sperimentali użati fl-evalwazzjonijiet tas-sikurezza (7).

▼**M8**

7. Jinkludi wkoll test ta' skrinjar tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp u, għal-hekk, jista' jintuża wkoll biex jipprovdi informazzjoni inizjali dwar l-effetti possibbli fuq il-prestazzjoni riproduttiva tal-irġiel u tan-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u tal-ħlas, fi stadju bikri tal-valutazzjoni tal-proprjetajiet tossikoloġiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, jew inkella fuq is-sustanzi kimiċi tat-test ta' tħassib. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni kompluta fuq l-aspetti kollha tar-riproduzzjoni u tal-iżvilupp. B'mod partikolari, dan joffri biss mezz limitat kif jiġu individwati l-manifestazzjonijiet ta' wara t-twelid ta' esponiment ta' qabel it-twelid, jew l-effetti li jistgħu jiġu indotti matul l-esponiment ta' wara t-twelid. Minħabba (fost raġunijiet oħra) is-selettività tal-punti ta' tmiem, u d-durata qasira tal-istudju, dan il-metodu mhux se jipprovdi evidenza għal dikjarazzjonijiet definiti ta' ebda effett fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp. Barra minn hekk, fin-nuqqas ta' *data* minn testijiet oħra dwar it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali.

8. Ir-riżultati miksubin mill-parametri relatati mas-sistema endokrinali għandhom jitqiesu fil-kuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi Interferenti Endokrinali" (8). F'dan il-Qafas Kunċettwali, it-TG 422 imtejba tal-OECD tinsab fil-livell 4 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti. Madankollu, sinjal endokrinali waħdu jaf ma jitqiesx evidenza suffiċjenti li s-sustanza kimika tat-test hi interferent endokrinali.

9. Dan il-metodu ta' ttestjar jenfasizza wkoll fuq l-effetti newroloġiċi bħala punt ta' tmiem, u fuq il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi bil-galbu tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni. Il-metodu għandu jidentifika is-sustanzi kimiċi li għandhom potenzjal newrotossiku, u li jistgħu jiġġustifikaw investigazzjoni approfondita ulterjuri ta' dan l-aspett. Barra minn hekk, il-metodu jista' jagħti wkoll indikazzjoni bażika tal-effetti immunoloġiċi.

10. Fin-nuqqas ta' *data* minn studji oħra dwar it-tossiċità sistemika, it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, in-newrotossiċità u/jew l-immunotossiċità, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali. It-test jista' jkun partikolarment siewi bħala parti mill-Ġabra ta' *Data* għall-Analiżi (SIDS) tal-OECD għall-valutazzjoni tas-sustanzi kimiċi eżistenti li għalihom ftit li xejn ikun hemm informazzjoni tossikoloġika disponibbli jew ebda informazzjoni affattu u jista' jservi bħala alternattiva għat-twettiq ta' żewġ testijiet separati għal tossiċità b'doża ripetuta (TG 407 tal-OECD, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness) u t-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp (TG 421 tal-OECD, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.63 ta' dan l-Anness), rispettivament. Jista' jintuża wkoll bħala studju ta' individwazzjoni tad-doża għal studji aktar estensivi dwar ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp, jew meta jitqies rilevanti għal xi raġuni oħra.

11. Ġeneralment jiġi preżunt li jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u mhux tqal. Konsegwentement, jista' jkun aktar kumplikat li jiġu determinati livelli tad-doża f'dan it-test kombinat li jkunu adegwati biex jiġu evalwati kemm it-tossiċità sistemika ġenerali kif ukoll it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp speċifika, minflok meta t-testijiet indiviwali jitwettqu b'mod separat. Barra minn hekk, l-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test fir-rigward tat-tossiċità sistemika ġenerali tista' tkun aktar diffiċli milli meta jitwettaq studju separat b'doża ripetuta, speċjalment meta l-parametri tas-serum u

▼M8

tal-istopatoloġija ma jkunux evalwati fl-istess ħin fl-istudju. Minħabba dawn il-kumplesstajiet tekniċi, hi meħtieġa esperjenza konsiderevoli fl-ittestjar tat-tossiċità għat-twettiq ta' dan it-test ta' skrinjar kombinat. Min-naħa l-oħra, apparti n-numru iżgħar ta' annimali involuti, it-test kombinat jista' joffri mezz aħjar kif jiġu disrkiminati l-effetti diretti fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp minn dawk li huma sekondarji għal effetti (sistemiċi) oħra.

12. F'dan it-test, il-perjodu ta' dożaġġ hu itwal milli fi studju konvenzjonali b'doża ripetuta fuq 28 jum. Madankollu, juża anqas annimali ta' kull sess għal kull grupp meta mqabbel mas-sitwazzjoni li fiha jitwettaq studju konvenzjonali b'doża ripetuta fuq 28 jum minbarra Test ta' Skrinjar tat-Tossiċità Riproduttiva/tal-Iżvilupp.

13. Dan il-metodu ta' ttestjar jassumi amministrazzjoni orali tas-sustanza kimika tat-test. Jaf ikun hemm bżonn ta' modifiki jekk jintużaw rotot oħra ta' esponiment.

14. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

15. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAT-TEST

16. Is-sustanza kimika tat-test tingħata f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' rġiel u nisa. L-irġiel għandhom jingħataw doża għal minimu ta' erba' ġimgħat, sal-jum ta' qabel il-qatla skedata (dan jinkludi minimu ta' ġimagħtejn qabel it-tgħammir, matul il-perjodu ta' tgħammir u, bejn wieħed u ieħor, ġimagħtejn wara t-tgħammir). Fid-dawl tal-perjodu ta' dożaġġ limitat ta' qabel it-tgħammir, il-fertilità jaf ma tkunx indikatur partikolarment sensittiv ta' tossiċità testikolari. Għaldaqstant, eżami istoloġiku dettaljat tat-testikoli hu essenzjali. Il-kombinazzjoni tal-perjodu ta' dożaġġ ta' qabel it-tgħammir ta' ġimagħtejn u l-osservazzjonijiet sussegwenti dwar it-tgħammir/il-fertilità b'perjodu ta' dożaġġ ġenerali ta' tal-anqas erba' ġimgħat, segwiti minn istopatoloġija dettaljata tal-gonadi tal-irġiel, hija meqjusa suffiċjenti biex tkun tista' tiġi individwata l-maġġoranza tal-effetti fuq il-fertilità u l-ispermatoġenesi tal-irġiel.

17. In-nisa għandhom jingħataw doża matul l-istudju kollu. Dan jinkludi ġimagħtejn qabel it-tgħammir (bl-objettiv li jkunu koperti tal-anqas żewġ ċikli estruż sħaħ), il-ħin varjabbli sal-konċepiment, id-durata tat-tqala u tal-anqas 13-il jum wara l-ħlas, sa u inkluż il-jum ta' qabel il-qatla skedata.

18. Id-durata tal-istudju, wara l-akklimatizzazzjoni u l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż ta' qabel id-dożaġġ, tiddependi mill-prestazzjoni tan-nisa u hi madwar 63 jum, [tal-anqas 14-il jum qabel it-tgħammir, (sa) 14-il jum tat-tgħammir, 22 jum tal-ġestazzjoni, 13-il jum tat-treddigħ].

19. Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib, kull jum għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

▼M8

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

20. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jintuża b'firien. Għandha tingħata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f'dan it-TG 422 ikunu investigati fi speċijiet oħra ta' rodituri. Fil-programm internazzjonali ta' validazzjoni għad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali fit-TG 407, il-far kien l-unika speċi użata. Ma għandhomx jintużaw razez b'fekundità baxxa jew li huma magħrufa li għandhom inċidenza għolja ta' difetti fl-iżvilupp. Għandhom ikunu użati annimali verġni f'saħħithom li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skont l-ispeċi, ir-razza, is-sess, il-piż u/jew l-età. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati ma għandux jaqbeż ± 20 % tal-valur medju ta' kull sess. Meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju fit-tul jew ta' ġenerazzjoni sħiħa, idealment fiż-żewġ studji jintużaw annimali li jkunu mill-istess razza u sors.

Abitazzjoni u għalf

21. Il-proċeduri kollha għandhom ikunu konformi ma' standards lokali tal-kura tal-annmali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperiment għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °). L-umdità relattiva għandha tkun tal-anqas ta' 30 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, billi l-fotoperjodu jkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata b'dan il-metodu.

22. L-annimali għandhom jitqiegħdu f'abitazzjoni fi gruppi żgħar tal-istess sess; l-annimali jistgħu jitqiegħdu f'abitazzjoni waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat. Għal gruppi f'gaġeġ, ma għandux ikun hemm aktar minn ħames annimali jabitaw f'gaġġa waħda. Il-proċeduri ta' tgħammir għandhom jitwettqu f'gaġeġ adattati għall-iskop. In-nisa tqal għandhom jitqiegħdu fil-gaġeġ waħedhom u jiġu pprovduti b'materjali tat-tibjit. In-nisa li jkunu qed ireddgħu jitqiegħdu f'gaġeġ waħedhom mal-wild tagħhom.

23. L-għalf għandu jkun analizzat regolarment għall-kontaminanti. Għandu jinżamm kampjun tad-dieta sakemm ikun iffinalizzat ir-rapport.

Preparazzjoni tal-annimali

24. Annimali adulti żgħażagħ b'saħħithom huma miġbura kif jinzerta u assenjati għall-gruppi tat-trattament u għall-gaġeġ. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati unikament u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom tal-anqas għal ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

Preparazzjoni tad-doża

25. Hu rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tingħata b'mod orali sakemm rotot oħra ta' amministazzjoni ma jitqisux aktar xierqa. Meta tingħażel ir-rotta orali, is-sustanza kimika tat-test normalment tingħata b'gavage; madankollu, f'każijiet oħra, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw ukoll mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb.

26. Meta jkun hemm bżonn, is-sustanza kimika tat-test tinħall jew tiġi sospiża f'veikolu xieraq. Hu rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel għandu jitqies l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni fl-ilma, segwit minn konsiderazzjoni ta' soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'veikoli oħra. Għal veikoli mhux milwiema, għandhom ikunu magħrufin il-karatteristiċi tossiċi tal-veikolu. Għandhom jiġu ddeterminati l-istabbiltà u l-omoġenità tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu.

▼M8

PROĊEDURA

Numru u Sess tal-annimali

27. Hu rakkomandat li kull grupp jinbeda b'tal-anqas 10 irġiel u 12-13-il mara. In-nisa jiġu evalwati qabel l-esponiment għaċ-ċikliċità estruża u l-annimali li ma jurux ċikli tipiċi ta' bejn erba' u ħamest ijiem ma jiddaħħlux fl-istudju; għaldaqstant, huma rakkomandati nisa żejda biex jinkisbu 10 nisa għal kull grupp. Ħlief fil-każ ta' effetti tossiċi ċari, hu mistenni li dan jipprovdi tal-anqas tmien nisa tqal għal kull grupp li normalment ikun in-numru minimu aċċettabbli ta' nisa tqal għal kull grupp. L-objettiv hu li jiġu prodotti biżżejjed nisa tqal u wlied biex tkun żgurata evalwazzjoni sinifikattiva tal-potenzjal tas-sustanza kimika tat-test biex taffettwa l-fertilità, it-tqala, l-imġiba materna u tat-treddigħ, u t-tkabbir u l-iżvilupp tal-ulied F_1, mill-konċepiment sa 13-il jum wara l-ħlas. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali ppjanati li jinqatlu qabel tmiem l-istudju. Għandha tingħata konsiderazzjoni għal grupp satellitarju addizzjonali ta' ħames annimali għal kull sess fil-grupp ta' kontroll u f'dak tad-doża l-aktar għolja għall-osservazzjoni ta' riversibbiltà, persistenza jew okkorrenza mdewma ta' effetti tossiċi sistemiċi, għal mill-anqas 14-il jum wara it-trattament. L-annimali tal-gruppi satellitarji ma jitgħammrux u, konsegwentement, ma jintużawx għall-valutazzjoni tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp.

Dożaġġ

28. Ġeneralment, tal-anqas għandhom jintużaw tliet gruppi għat-test u grupp ta' kontroll. Jekk ma jkun hemm l-ebda *data* adattata disponibbli dwar it-tossiċità ġenerali, jista' jsir studju dwar tiftix ta' firxa (annimali tal-istess razza u sors) bħala għajnuna għad-determinazzjoni tad-doża li jkollhom jintużaw. Ħlief għat-trattament bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu biex tkun amministrata s-sustanza kimika tat-test, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat.

29. Il-livelli tad-doża għandhom jintgħażlu b'kunsiderazzjoni ta' kwalunkwe *data* eżistenti disponibbli dwar it-tossiċità u l-kinetika (jew it-tossikokinetika). Ta' min iqis ukoll li jista' jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u annimali mhux tqal. L-ogħla livell ta' doża għandu jintgħażel bl-għan li jġib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija evidenti. Wara, għandha tingħażel sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża bl-għan li jintwerew kwalunkwe reazzjoni relatata mad-dożaġġ u ebda effett avvers fl-anqas livell tad-doża. Intervalli ta' darbtejn jew ta' erba' darbiet ta' spiss ikunu ottimali u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test sikwit spiss tkun preferibbli milli jintużaw intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

30. Meta jkun hemm tossiċità ġenerali osservata (eż. piż tal-ġisem imnaqqas, effetti tal-fwied, qalb, pulmun jew kliewi, eċċ.) jew tibdiliet oħra li jistgħu ma jkunux risponsi tossiċi (eż. konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensittivi endokrinali għandhom ikunu interpretati b'kawtela.

Test tal-limitu

31. Jekk studju orali b'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum jew, għall-amministrazzjoni tad-dieta, ta' perċentwali ekwivalenti fid-dieta, jew ta' ilma tax-xorb (fuq il-bażi tad-determinazzjonijiet tal-piż tal-ġisem), billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi osservabbli u jekk ma tkunx mistennija tossiċità bbażata fuq *data* minn sustanzi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju

▼M8

sħiħ bl-użu ta' diversi livelli ta' doża jista' ma jitqiesx li jkun meħtieġ. It-test ta' limitu japplika ħlief meta espożizzjoni umana tindika l-ħtieġa li jkollu jintuża livell ogħla ta' doża. Għal tipi oħrajn ta' amministrazzjoni, bħal ma hi l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, bħal kemm tinħall, ta' spiss jistgħu jiddettaw l-esponiment massimu li jista' jinkiseb.

Amministrazzjoni tad-doża

32. L-annimali jingħataw doża tas-sustanza kimika tat-test darba kuljum għal sebat ijiem f'ġimgħa. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata b'gavage, dan għandu jsir b'doża singola lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Ħlief għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

33. Għal sustanzi kimiċi tat-test mogħtija permezz tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza kimika tat-test involuti ma jxekklux in-nutrizzjoni jew il-bilanċ tal-ilma normali. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata fid-dieta, konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal, jista' jkun użat; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal sustanza amministrata b'gavage, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili ta' kull jum, u tiġi aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa biex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal. Meta l-istudju kombinat jintuża bħala preliminari għal studju tat-tossiċità riproduttiva fit-tul jew sħiħ, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

Skeda sperimentali

34. Id-dożaġġ taż-żewġ sessi għandu jibda ġimagħtejn (2) qabel it-tgħammir, wara li jkunu tħallew iderru għal tal-anqas ħamest ijiem u n-nisa jkunu ġew skrinjati għaċ-ċikli estrużi normali (f'perjodu ta' pretrattament ta' ġimagħtejn). L-istudju għandu jkun skedat b'tali mod li l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż tibda ftit wara li l-annimali jkunu kisbu maturità sesswali sħiħa. Dan jista' jvarja ftit għal razez differenti ta' firien f'laboratorji differenti, eż. firien Sprague Dawley ta' 10 ġimgħat, firien Wistar li jkollhom madwar 12-il ġimgħa. L-ommijiet b'wild għandhom jinqatlu fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara. Biex l-ommijiet jitħallew isumu qabel il-ġbir tad-demm (jekk din l-għażla tkun preferuta), l-ommijiet u uliedhom mhux bilfors ikollhom jinqatlu fl-istess jum. Il-jum tat-twellid (meta jitlesta l-ħlas) hu definit bħala l-jum 0 wara l-ħlas. In-nisa li ma juru ebda evidenza ta' tgħammir jinqatlu 24-26 jum wara l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir. Id-dożaġġ jissokta għaż-żewġ sessi matul il-perjodu ta' tgħammir. L-irġiel għandhom jibqgħu jingħataw id-doża wara l-perjodu ta' tgħammir tal-anqas sakemm jitlesta l-perjodu minimu totali ta' dożaġġ ta' 28 jum. Imbagħad dawn jinqatlu jew inkella jinżammu u jibqgħu jingħataw id-doża għat-twettiq possibbli tat-tieni fażi ta' tgħammir jekk jitqies li din tkun xierqa.

35. Id-dożaġġ ta' kuljum tan-nisa ommijiet għandu jkompli matul it-tqala u tal-anqas sal-jum 13 wara l-ħlas, b'dan il-jum inkluż, jew sal-jum ta' qabel is-sagrifiċċju. Għall-istudji li fihom is-sustanza kimika tat-test tingħata bit-teħid man-nifs jew bir-rotta dermali, id-dożaġġ għandu jkompli tal-anqas sal-jum 19 tal-ġestazzjoni, b'dan il-jum inkluż, u d-dożaġġ għandu jerġa' jinbeda mill-aktar fis possibbli u mhux aktar tard mill-jum 4 ta' wara t-twelid (PND).

▼M8

36. L-annimali fi grupp satellitarju skedati għall-osservazzjonijiet ta' segwitu, jekk jiġu inklużi, ma jitħallewx jitgħammru. Dawn għandhom jinżammu tal-anqas għal 14-il jum ulterjuri wara l-ewwel qtil skedat tal-ommijiet, mingħajr trattament biex jiġu individwati okkorrenza ttardjata, jew persistenza ta' effetti tossiċi jew irkupru minn dawn.

37. Dijagramma tal-iskeda sperimentali hi mogħtija fl-Appendiċi 2.

Ċikli estruż

38. Iċ-ċikli estruż għandhom jiġu ssorveljati qabel ma jibda t-trattament biex għall-istudju jintgħażlu nisa b'ċikliċità regolari (ara l-paragrafu 27). It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu ssorveljati ta' kuljum ukoll mill-bidu tal-perjodu ta' trattament sal-evidenza ta' tgħammir. Jekk ikun hemm tħassib dwar effetti akuti ta' stress li jistgħu jbiddlu ċ-ċikli estruż bit-tnedija tad-dożaġġ, il-laboratorji jistgħu jesponu l-annimali tat-test għal ġimagħtejn (2), imbagħad jiġbru tiċpisiet vaġinali ta' kuljum biex jissorveljaw iċ-ċiklu estruż għal minimu ta' ġimagħtejn matul il-perjodu ta' qabel it-tgħammir b'monitoraġġ issoktat fil-perjodu ta' tgħammir sakemm ikun hemm evidenza ta' tgħammir. Meta jinkisbu ċelloli vaġinali/ċervikali, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tfixkil tal-mukoża, li jista' jinduċi psewdotqala (8) (9).

Priċedura tat-tgħammir

39. Normalment, f'dan l-istudju għandu jsir tgħammir 1:1 (raġel wieħed ma' mara waħda). Jista' jkun hemm eċċezzjonijiet f'każ ta' mwiet okkażjonali tal-irġiel. Il-mara għandha titqiegħed mal-istess raġel sakemm tiġi osservata evidenza ta' tgħammir jew ikunu għaddew ġimagħtejn. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tapp vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala hu definit bħala l-jum li fih tiġi kkonfermata evidenza ta' tgħammir (jinstabu tapp vaġinali jew sperma). Fil-każ li l-par ma jkunx irnexxa, jista' jiġi kkunsidrat it-tgħammir mill-ġdid ta' nisa ma' rġiel diġa ipprovati tal-istess grupp.

Daqs tal-boton

40. Fil-jum 4 wara t-twelid, id-daqs ta' kull boton jista' jiġi aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda b'għażla aleatorja biex jitrendew, l-aktar viċin possibbli, erba' jew ħamest ifrieħ għal kull sess għal kull boton skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użata. Il-kampjuni tad-demm għandhom jinġabru minn tnejn mill-frieħ eċċessivi, jiġu raggruppati, u jintużaw għad-determinazzjoni tal-livelli tas-serum T4. Ma għandhiex issir eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż. fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem jew tad-distanza anoġenitali (AGD). Mull meta n-numru ta' frieħ irġiel jew nisa jipprevjeni milli jkun hemm erbgħa jew ħamsa minn kull sess għal kull boton, hu aċċettabbli li jsir aġġustament parzjali (pereżempju, sitt irġiel u erba' nisa). Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas mill-mira tal-qtil (8 jew 10 ferħ/boton). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mill-mira tal-qtil, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

41. Jekk id-daqs tal-boton ma jkunx aġġustat, żewġt ifrieħ għal kull boton jiġu sagrifikati fil-jum 4 wara t-twelid u jittieħdu l-kampjuni tad-demm għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal-ormon tat-tirojde tas-serum. Jekk possibbli, iż-żewġt ifrieħ għal kull boton għandhom ikunu frieħ nisa biex il-frieħ irġiel jinżammu għall-evalwazzjonijiet taż-żamma tal-beżżula, ħlief fil-każ li jekk jitneħħew dawn il-frieħ ma jifdal ebda nisa għall-valutazzjoni fit-terminazzjoni. Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas minn 8 jew 10 ifrieħ/boton (skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użati). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mid-daqs normali tal-boton, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

▼M8

Osservazzjonijiet

42. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u b'kunsiderazzjoni tal-perjodu bl-ogħla livell ta' effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni tas-saħħa tal-annimali għandha tiġi rreġistrata. Tal-inqas darbtejn kuljum l-annimali kollha jiġu osservati għal morbidità u għal mortalità.

43. Darba qabel l-ewwel esponiment (biex ikunu jistgħu jsiru paraguni fi ħdan l-istess suġġetti), u tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi dettaljati fl-annimali ġenituri kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa f'arena standard u preferebbilment fl-istess jum kull darba. Dawn għandhom jiġu reġistrati bir-reqqa; idealment bl-użu ta' sistemi ta' punteġġ, definiti b'mod espliċitu mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandu jsir sforz biex ikun żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test ikunu minimi u li l-osservazzjonijiet preferibbilment jitmexxew minn osservaturi li ma jkunux jafu bit-trattament. Is-sinjali osservati għandhom jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, tibdliet fil-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż., dmugħ, piloerezzjoni, daqs tal-ħabba, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Tibdliet fil-mixja, fil-qagħda u fir-rispons għal immaniġġar, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv), ħlas bit-tbatija jew fit-tul jew imġiba biżarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (10).

44. Darba matul l-istudju, ir-reattività sensorjali għal stimoli ta' modalitajiet differenti (eż. stimoli awditorji, viżwali u proprjoċettivi) (8) (9) (11), valutazzjoni tas-saħħa tal-qabda (12) u valutazzjoni tal-attività motorja (13) għandhom isiru f'ħamest irġiel u f'ħames nisa, magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp. Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi. Fl-irġiel, dawn l-osservazzjonijiet funzjonali għandhom isiru lejn tmiem il-perjodu tad-dożaġġ, ftit qabel il-qtil skedat iżda qabel il-kampjunar tad-demm għall-ematoloġija jew għall-kimika klinika (ara l-paragrafi 53-56, inkluża n-nota 1 f'qiegħ il-paġna). In-nisa għandhom ikunu fi stat fiżjoloġikament simili matul dawn it-testijiet funzjonali u idealment għandhom jiġu ttestjati darba matul l-aħħar ġimgħa tat-treddigħ (eż. LD 6-13), ftit qabel il-qtil skedat. Sa fejn possibbli, naqqas il-ħinijiet ta' separazzjoni tal-ommijiet u tal-frieħ.

45. Osservazzjonijiet funzjonali li jsiru darba lejn tmiem l-istudju jistgħu jitħallew barra meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju subkroniku sussegwenti (90 jum) jew fit-tul. F'dak il-każ, l-osservazzjonijiet funzjonali għandhom ikunu inklużi f'dan studju ta' segwitu. Min-naħa l-oħra, id-disponibbiltà ta' *data* dwar osservazzjonijiet funzjonali minn dan l-istudju b'doża ripetuta tista' ssaħħaħ il-kapaċità biex jintgħażlu dożi għal studju subkroniku sussegwenti jew fit-tul.

46. Bħala eċċezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu wkoll jitħallew barra għal gruppi li xort'oħra juru sinjali ta' tossiċità tant li tfixkel b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.

47. Id-durata tal-ġestazzjoni għandha tiġi reġistrata u hi kkalkolata mill-jum 0 tat-tqala. Kull boton għandu jiġi eżaminat mill-aktar fis possibbli wara l-ħlas biex jiġu stabbiliti n-numru u s-sess tal-frieħ, it-twelid mejjet, it-twelid ħaj, it-twelid mhux żviluppat (frieħ li jkunu ferm iżgħar mill-frieħ tal-kontroll korrispondenti), u l-preżenza ta' anormalitajiet serji.

▼M8

48. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jitqassmu skont is-sess u kull boton għandu jintiżen fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Minbarra l-osservazzjonijiet fuq l-annimali ġenituri (ara l-paragrafi 43 u 44), kwalunkwe mġiba anormali tal-wild għandha tiġi reġistrata.

49. L-AGD ta' kull ferħ għandha titkejjel fl-istess jum postnatali bejn il-PND 0 sal-PND 4. Il-piż tal-ġisem tal-frieħ għandu jinġabar dakinhar li titkejjel l-AGD u l-AGD għandha tiġi normalizzata għal kejl tad-daqs tal-ferħ, idealment l-għerq kwadrat tal-piż tal-ġisem (14). In-numru ta' bżieżel/areoli fil-frieħ irġiel għandu jingħadd fil-PND 12 jew 13 kif rakkomandat fil-GD 151 tal-OECD (15).

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel/ilma

50. L-irġiel u n-nisa għandhom jintiżnu fl-ewwel jum tad-dożaġġ, tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, u fit-terminazzjoni. Matul it-tqala, in-nisa għandhom jintiżnu fil-jiem 0, 7, 14 u 20 u fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom ikunu rapportati individwalment għal kull annimal adult.

51. Matul il-fażi ta' qabel it-tgħammir, it-tqala u t-treddigħ, il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel tal-anqas darba fil-ġimgħa. Il-kejl tal-konsum tal-ikel matul it-tgħammir hu fakultattiv. Il-konsum tal-ikel matul dawn il-perjodi għandu jitkejjel ukoll meta s-sustanza kimika tat-test tingħata b'dak il-medium.

Ematoloġija

52. Darba matul l-istudju, għandhom isiru l-eżaminazzjonijiet ematoloġiċi li ġejjin f'ħamest irġiel u ħames nisa magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp: ematokrit, konċentrazzjoni ta' emoglobina, l-għadd ta' eritroċiti, retikuloċiti, l-għadd totali u differenzjali tal-lewkoċiti, l-għadd tal-pjastrini u kejl tal-ħin/potenzjali ta' koagulazzjoni. Determinazzjonijiet oħra li għandhom isiru, jekk is-sustanza kimika tat-test jew il-metaboliti putattivi tagħha jkollhom jew ikunu ssuspettati li jkollhom proprjetajiet ossidanti, jinkludu konċentrazzjoni ta' metemoglobina u l-korpi ta' Heinz.

53. Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn sit imsemmi. In-nisa għandhom ikunu fi stat fiżjoloġikament simili matul il-kampjunar. Biex jiġu evitati diffikultajiet prattiċi relatati mal-varjabbiltà fil-bidu tal-ġestazzjoni, il-ġbir tad-demm fin-nisa jista' jsir fi tmiem il-perjodu ta' tgħammir bħala alternattiva għall-kampjunar eżatt qabel il-proċedura għall-ewtanażja tal-annimali jew bħala parti minn din. Il-kampjuni tad-demm tal-irġiel idealment għandhom jittieħdu eżatt qabel l-ewtanażja tal-annimali jew bħala parti minn din. Inkella, il-ġbir tad-demm fl-irġiel jista' jsir ukoll fi tmiem il-perjodu ta' tgħammir meta dan il-punt ta' żmien ikun ingħata preferenza għan-nisa.

54. Il-kampjuni tad-demm għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa.

Bijokimika klinika

55. Id-determinazzjonijiet tal-bijokimika klinika biex jiġu investigati effetti tossiċi kbar f'tessuti u, b'mod speċifiku, l-effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demm miksuba mill-ħamest irġiel u

▼M8

mill-ħames nisa magħżula ta' kull grupp. Hu rakkomandat is-sawm mal-lejl tal-annimali qabel it-teħid tal-kampjuni tad-demm ([1]). L-investigazzjonijiet tal-plażma jew serum għandhom jinkludu is-sodju, il-potassju, il-glokożju, il-kolesterol totali, l-urea, il-kreatinina, il-proteini u l-albumina totali, tal-anqas żewġ enzimi indikattivi ta' effetti epatoċellulari (bħalma huma l-alanina aminotransferaži, aspartataminotransferaži u sorbitol deidroġenaži) u aċidi biljari. Il-kejl ta' enzimi addizzjonali (ta' oriġini epatika jew oriġinijiet oħra) u ta' bilirubina jistgħu jipprovdu informazzjoni utli f'ċerti ċirkostanzi.

56. Il-kampjuni tad-demm minn sit definit jittieħdu fuq il-bażi tal-iskeda li ġejja:

— minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fil-jum 4 wara t-twelid, jekk in-numru ta' frieħ jippermetti (ara l-paragrafi 40-41)

— mill-ommijiet kollha u minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fit-terminazzjoni fil-jum 13, u

— mill-irġiel adulti kollha, fit-terminazzjoni

Il-kampjuni kollha tad-demm jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Kampjuni tad-demm mill-frieħ tal-jum 13 u mill-irġiel adulti jiġu vvalutati għal-livelli tas-serum għall-ormoni tat-tirojde (T4). Issir valutazzjoni ulterjuri tat-T4 fil-kampjuni tad-demm għall-ommijiet u għall-frieħ tal-jum 4 jekk tkun rilevanti. Hemm l-għażla li jistgħu jitkejlu ormoni oħra jekk ikunu rilevanti. Id-demm tal-frieħ jista' jiġi raggruppat skont il-boton għall-analiżijiet tal-ormon tat-tirojde. L-ormoni tat-tirojde (T4 u TSH) idealment għandhom jitkejlu bħala "total".

57. Hemm l-għażla li jsiru d-determinazzjonijiet tal-urinaliżi li ġejjin f'ħamest irġiel magħżula b'mod aleatorju ta' kull grupp matul l-aħħar ġimgħa tal-istudju bl-użu ta' ġbir ta' volum ta' urina bil-ħin miżmum; l-apparenza, il-volum, l-ożmolalità jew gravità speċifika, il-pH, il-proteini, il-glukożju u d-demm/iċ-ċelloli tad-demm.

58. Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar tas-serum ta' ħsara ġenerali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet oħra li għandhom jitwettqu jekk il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza kimika tat-test jistgħu, jew huma suspettati li jaffettwaw il-profili metaboliċi relatati jinkludu il-kalċju, it-trigliċeridi waqt sawm u l-glukożju waqt sawm, l-ormoni speċifiċi, il-metaemoglobina u l-kolinesterasi. Dawn jeħtieġ li jiġu eżaminati fuq bażi ta' każ b'każ.

59. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-konċentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:

— il-ħin tal-qatla minħabba varjazzjonijiet tul il-jum tal-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

([1]) Għal għadd ta' kejlijiet ta' serum u plażma, l-aktar għall-glukożju, is-sawm tul il-lejl ikun ippreferut. Ir-raġuni ewlenija għal din il-preferenza hi li aktar varjabbiltà li għandha inevitabbilment tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, tittendi li taħbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċili. Madankollu, min-naħa l-oħra, is-sawm matul il-lejl jista' jinterferixxi mal-metaboliżmu ġenerali tal-annimali (tqal), itellef it-treddigħ u l-imġiba tat-treddigħ, u, b'mod partikolari fi studji dwar it-tagħlif, jista' jfixkel l-esponiment ta' kuljum għas-sustanza kimika tat-test. Jekk ikun adottat sawm tul il-lejl, id-determinazzjonijiet bijokimiċi kliniċi għandhom isiru wara li jkunu twettqu l-osservazzjonijiet funzjonali fir-raba' (4) ġimgħa tal-istudju għall-irġiel. L-ommijiet għandhom jinżammu għal jum ieħor wara li l-frieħ jitneħħew fil-PND 13, pereżempju). L-ommijiet għandhom jitħallew isumu tul il-lejl mill-jum tat-treddigħ 13-14 u d-demm terminali jintuża għall-parametri kimiċi kliniċi.

▼**M8**

— il-metodu tal-qatla biex tkun evitata tensjoni bla bżonn għall-annimali li tista' taffettwa l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— is-settijiet tat-testijiet għad-determinazzjonijiet tal-ormoni li jistgħu jkunu differenti mill-kurvi standard tagħhom.

60. Kampjuni ta' plażma maħsubin speċifikatament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f'ħin komparabbli tal-jum. Il-valuri numeriċi miksubin meta jkunu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta' analiżi kummerċjali.

61. Jekk bażi ta' *data* storika ma tkunx adegwata, għandha tingħata kunsiderazzjoni lid-determinazzjoni ta' varjabbli ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel ma jibda d-dożaġġ jew preferibbilment f'sett ta' annimali mhux inklużi fil-gruppi ta' esperimenti. Għan-nisa, id-*data* trid tiġi minn annimali li jreddgħu.

PATOLOĠIJA

Nekroskopija grossa

62. L-annimali adulti kollha fl-istudju għandhom ikunu ssoġġettati għal nekroskopija profonda sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għal-organi tas-sistema riproduttiva. In-numru ta' siti ta' impjantazzjoni għandu jiġi reġistrat. It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu eżaminati dakinhar tan-nekroskopija biex jiġi determinat l-istadju taċ-ċiklu estruż u tkun tista' ssir korrelazzjoni mal-istopatoloġija tal-organi riproduttivi tan-nisa.

63. It-testikoli u l-epididimidi kif ukoll il-bżieżaq tal-prostata u seminali bil-glandoli koagolanti fis-sħuħija tagħhom, tal-annimali adulti rġiel kollha għandhom jiġu mirquma minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u l-piż niedi tagħhom għandu jittieħed mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. Barra minn hekk, il-piżijiet tal-organi fakultattivi jistgħu jinkludu l-kumpless tal-levator ani u tal-muskolu bulbokavernuż, il-glandoli ta' Cowper u r-ras tal-pene fl-irġiel u l-ovarji f'pari (piż imxarrab) u l-utru (inkluż iċ-ċerviċi) fin-nisa; jekk inklużi, dawn il-piżijiet għandhom jinġabru mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni. L-ovarji, it-testikoli, l-epididimu, l-organi sesswali aċċessorji, u l-organi kollha li juru leżjonijiet makroskopiċi tal-annimali adulti kollha għandhom jiġu preservati.

64. Għall-irġiel u għan-nisa adulti kollha u għal raġel wieħed u għal mara waħda li jkunu frieħ tal-jum 13 minn kull boton, il-glandoli tat-tirojde għandhom jiġu preservati fl-aktar medium ta' fissazzjoni xierqa għall-eżami istopatoloġiku sussegwenti maħsub. Il-piż tat-tirojde jista' jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirqim għandu jsir ukol b'reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-ħsara lit-tessut. Il-ħsara fit-tessut tista' tippreġudika analiżi istopatoloġika. Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn sit imsemmi eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtanażja tal-annimali, u għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa (ara l-paragrafu 56).

▼M8

65. Barra minn hekk, għal tal-anqas ħamest irġiel u nisa adulti, magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp (minbarra dawk misjuba fi stat ta' agunija u/jew ewtanizzati qabel it-terminazzjoni tal-istudju), il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-timus, il-milsa, il-moħħ u l-qalb għandhom jitraqqmu minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq u l-piż tagħhom għandu jittieħed mill-aktar fis wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni ispatoloġika maħsuba sussegwenti: il-leżjonijiet kbar kollha, il-moħħ (reġjuni rappreżentattivi li jinkludu ċ-ċerebru, iċ-ċerebellum u l-pons), is-sinsla tad-dahar, l-għajn, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inklużi l-irqajja' ta' Peyer), il-fwied, il-kliewi, l-adernali, il-milsa, il-qalb, it-timus, it-trakea u l-pulmun (preservat bl-infiħ b'fissattiv u mbagħad mgħaddas), il-gonadi (testikoli u ovarji), l-organi sesswali aċċessorji (utru u ċerviċi, epididimu, prostata, bżieżaq seminali u l-glandoli koagolanti), il-vaġina, il-borża tal-awrina, il-limfonodi (minbarra l-aktar limfonodu drenanti prossimali, għandu jittieħed limfonodu ieħor skont l-esperjenza tal-laboratorju (16)), in-nerv periferali (xjatiku jew tibjali) idealment qrib il-muskolu, il-muskolu skeletali u l-għadma, bil-mudullun (sezzjoni jew inkella aspirat tal-mudullun immuntat ġdid). Hu rrakkomandat li t-testikoli jkunu ffissati b'immersjoni fil-fissattiv ta' Bouin jew f'dak modifikat ta' Davidson (16) (17) (18); fissazzjoni tal-formalina mhix rakkomandata għal dawn it-tessuti. It-tunika albuġinea tista' tittaqqab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b'labra biex jitħalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza kimika tat-test.

66. It-tessuti li ġejjin jistgħu jagħtu indikazzjoni siewja għall-effetti relatati mal-endokrina: Il-gonadi (ovarji u testikoli), l-organi sesswali aċċessorji (utru li jinkludi ċerviċi, epididimu, bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni, prostata dorsolaterali u ventrali), il-vaġina, il-glandola pitwitarja tal-mammiferi rġiel u l-glandola adrenali. It-tibdiliet fil-glandoli tal-mammiferi rġiel ma kinux iddokumentati b'mod suffiċjenti iżda dan il-parametru jista' jkun sensittiv ħafna għal sustanzi b'azzjoni estroġenika. L-osservazzjoni tal-organi/tat-tessuti li mhumiex elenkati fil-paragrafu 65 hi fakultattiva.

67. Frieħ mejtin u frieħ maqtula fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara, tal-anqas għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa esternament għal anormalitajiet serji. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-ġenitali riproduttivi esterni li għandhom jiġu eżaminati għal sinjali ta' żvilupp mibdul.

Istopatoloġija

68. Għandha ssir istopatoloġija sħiħa fuq l-organi u t-tessuti preservati tal-annimali magħżula fil-gruppi tal-kontroll u ta' doża għolja (b'enfasi speċjali fuq l-istadji tal-ispermatoġenesi fil-gonadi tal-irġiel u l-istopatoloġija tal-istruttura taċ-ċelloli testikolari interstizjali). Il-glandola tat-tirojde mill-frieħ u mill-annimali adulti li jifdal tista' tiġi eżaminata meta jkun hemm bżonn. Dawn l-eżaminazzjonijiet għandhom ikunu estiżi għall-annimali tal-gruppi l-oħra ta' dożaġġ, jekk jiġu osservati tibdiliet relatati mat-trattament fil-grupp ta' doża għolja. Il-Gwida dwar l-istopatoloġija (10) tagħti aktar informazzjoni dwar id-dissezzjoni, il-fissazzjoni, is-sezzjonar u l-istopatoloġija ta' tessuti endokrinali.

69. Il-feriti kbar kollha għandhom jiġu eżaminati. Bħala għajnuna fl-iċċarar tal-NAOELs, l-organi fil-mira fi gruppi ta' doża oħra għandhom jiġu eżaminati, b'mod partikolari fi gruppi li jiġi ddikjarat li juru NAOEL.

▼M8

70. Meta jintuża grupp satellitarju, l-istopatoloġija għandha ssir fuq tessuti u organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi ttrattati.

DATA U RAPPORTAR

Data

71. Għandha tkun ipprovduta d-*data* dwar l-annimali individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tingħabar f'forma tabulari, u għal kull grupp tat-test għandha turi n-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjuba mejta matul it-test jew ewtanizzati għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew ewtanażja, in-numru ta' annimali fertili, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inklużi l-ħin tal-ewwel darba, id-durata, u s-severità ta' kwalunkwe effett tossiku, it-tip ta' tibdiliet istopatoloġiċi u d-*data* rilevanti kollha dwar il-boton. Format tabulari tar-rapport ta' sommarju li wera li hu tassew siewi għall-evalwazzjoni tal-effetti riproduttivu/tal-iżvilupp hu mogħti fl-Appendiċi 3.

72. Meta jkun possibbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-paraguni tal-effett tul firxa tad-doża għandhom jevitaw l-użu ta' testijiet-t multipli. Il-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju. Analiżi statistika tal-AGD u taż-żamma tal-beżżula għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tal-effetti fuq il-boton. Fejn xieraq, il-boton hu l-unità ta' analiżi. Analiżi statistika tal-piż tal-ġisem tal-frieħ għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tad-daqs tal-boton. Minħabba d-dimensjonijiet limitati tal-istudju, l-analiżijiet statistiċi fil-forma ta' testijiet għal "sinifikat" huma ta' valur limitat għal ħafna punti ta' tmiem, speċjalment il-punti ta' tmiem riproduttivi. Uħud mill-aktar metodi użati ta' spiss, speċjalment testijiet parametriċi għall-kejl tat-tendenza ċentrali, mhumiex adattati. Jekk jintużaw analiżijiet statistiċi, il-metodu magħżul għandu jkun xieraq għad-distribuzzjoni tal-varjabbli eżaminat, u jintgħażel qabel il-bidu tal-istudju.

Evalwazzjoni tar-riżultati

73. Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossiċità għandhom jiġu evalwati f'termini tal-effetti osservati, tan-nekroskopija u tas-sejbiet mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni bejn id-doża u s-sustanza kimika tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità tal-annormalitajiet, inklużi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, l-infertilità, l-anormalitajiet kliniċi, l-imġiba tar-riproduzzjoni u l-boton affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħra.

74. Minħabba l-perjodu qasir ta' trattament tal-irġiel, l-istopatoloġija tat-testikoli u tal-epididimu għandha tiġi kkunsidrata flimkien mad-*data* dwar il-fertilità meta jiġu vvalutati l-effetti riproduttivi fuq l-irġiel. L-użu ta' *data* storika tal-kontroll fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp (eż. għad-daqs tal-boton, l-AGD, iż-żamma tal-beżżula, il-livelli tas-serum T4), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.

75. Għall-kontroll tal-kwalità huwa propost li tingħabar *data* storika ta' kontroll u li għad-*data* numerika jkunu kkalkolati l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni, speċjalment għall-parametri li jkollhom rabta mad-detezzjoni tal-interferent endokrinali. Din id-*data* tista' tintuża għal finijiet ta' paragun meta jkunu evalwati studji attwali.

▼M8

Rapport tat-test

76. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Veikolu (jekk xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' veikolu, jekk ma jkunx ilma.

L-annimali tat-test:

— speċi/razza użata;

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

— ġustifikazzjoni għal speċi jekk ma jkunx far

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/il-preparazzjoni tad-dieta, il-konċentrazzjoni, l-istabbiltà u l-omoġenità miksubin tal-preparazzjoni,

▼M8

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— konverżjoni minn dieta/konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura ta' każwalizzazzjoni biex jintgħażlu l-frieħ għall-qtil, jekk jinqatlu.

Riżultati:

— piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk applikabbli;

— id-*data* dwar ir-rispons tossiku skont is-sess u d-doża, inklużi l-fertilità, il-ġestazzjoni u kwalunkwe sinjal ieħor ta'

— tossiċità;

— it-tul tal-ġestazzjoni; l-effetti tossiċi jew oħra fuq ir-riproduzzjoni, l-ulied, it-tkabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;

— natura, severità u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);

— attività sensorja, qawwa tal-qabda u valutazzjonijiet tal-attività motorja;

— testijiet ematoloġiċi b'valuri bażi rilevanti;

— testijiet ta' bijokimika klinika b'valuri linja bażi rilevanti;

— in-numru ta' nisa adulti b'ċiklu estruż normali jew anormali u d-durata taċ-ċiklu;

— in-numru ta' twelid ħaj u ta' telf ta' wara l-impjantazzjoni;

— in-numru ta' frieħ b'anormalitajiet ferm viżibbli; evalwazzjoni profonda tal-ġenitali esterni, in-numru ta' frieħ li jitwieldu żgħar ħafna;

— il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqgħu ħajjin fit-terminazzjoni tat-test;

— in-numru ta' impjantazzjonijiet, id-daqs tal-boton u l-piżijiet tal-boton fil-ħin tar-reġistrazzjoni;

— id-*data* dwar il-piż tal-ġisem tal-frieħ

— l-AGD tal-frieħ kollha (u l-piż tal-ġisem fl-jum tal-kejl tal-AGD)

— iż-żamma tal-beżżula fil-frieħ irġiel,

— il-livelli tal-ormon tat-tirojde, il-frieħ tal-jum 13 u l-irġiel adulti (u l-ommijiet u l-frieħ tal-jum 4 jekk jitkejlu)

— il-piż tal-ġisem fis-sagrifiċċju u d-*data* dwar il-piż tal-organi għall-annimali ġenituri;

— sejbiet dwar in-nekroskopija,

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi;

— id-dettalji tal-assorbiment (jekk disponibbli);

— trattament ta' statistika ta' riżultati, fejn jixraq.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

▼M8

Interpretazzjoni tar-Riżultati

77. L-istudju jipprovdi evalwazzjonijiet tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp assoċjata mal-amministrazzjoni ta' doża ripetuti. B'mod partikolari, peress li l-enfasi hi mixħuta kemm fuq il-punti ta' tmiem tat-tossiċità ġenerali kif ukoll tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżutlati tal-istudju jippermettu li ssir distinzjoni bejn l-effetti fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp li jseħħu fin-nuqqas ta' tossiċità ġenerali u dawk li jkunu espressi biss f'livelli li jkunu tossiċi għall-annimali ġenituri wkoll (ara l-paragrafi 7-11). Jista' jipprovdi indikazzjoni tal-ħtieġa li jsiru investigazzjonijiet ulterjuri u jista' jipprovdi gwida fit-tfassil tal-istudji sussegwenti. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 għandu jiġi kkonsultat għal għajnuna fl-interpetazzjoni tar-riżultati dwar ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp (19). Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 106 dwar l-Evalwazzjoni Istoloġika tat-Testijiet Endokrinali u Riproduttivi fir-Rodituri (16) jipprovdi informazzjoni dwar it-tħejjija u l-evalwazzjoni tal-organi (endokrinali) u tat-tiċpisiet vaġinali li jistgħu jkunu ta' għajnuna għal dan il-metodu ta' ttestjar.

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (1990). Dokument tas-seduta Nru 1 għall-14-il Laqgħa Konġunta tal-Chemicals Group and Management Committee. Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(2) OECD (1992). Ir-Rapport tal-President tal-Laqgħa ta' Esperti *ad hoc* dwar il-Metodi ta' Skrinjar tat-Tossiċità Riproduttiva, Tokyo, 27-29 ta' Ottubru, 1992. Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. u Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. u Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Rapport tal-Ewwel Laqgħa tat-Task Force tal-OECD dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (EDTA), 10-11 ta' Marzu 1998, Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.u Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Parti B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, f'Auston C.R. u Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. u Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. u Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp u V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(16) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(17) Hess RA u Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Fi: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼**M8**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET (ARA WKOLL (20) GD 150 TAL-OECD)

Androġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T3) f'organiżmu mammiferu.

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita.

Tossiċità tal-iżvilupp il-manifestazzjoni tat-tossiċità riproduttiva, li tirrappreżenta disturbi strutturali jew funzjonali prenatali, perinatali u post natali fil-wild.

Doża hi l-ammont ta' sustanza kimika tat-test mogħtija. Id-doża hi espressa bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità ta' piż tal-ġisem ta' annimal tat-test għal kull jum (eż. mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jew bħala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Dożaġġ hi terminu ġenerali li jinvolvi d-doża, il-frekwenza tagħha u d-durata tad-dożaġġ.

Tossiċità evidenti hi terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun ġiet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu u għandhom ikunu tali li żieda fid-doża amministrata tista' tkun mistennija li tirriżulta fl-iżvilupp ta' sinjali ta' tossiċità estrema u probabbilment mortalità.

Indeboliment tal-fertilità tirrappreżenta disturbi tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel jew tan-nisa.

Tossiċità materna effetti avversi fuq nisa tqal, li jseħħu b'mod speċifiku (effett dirett) jew mhux speċifiku (effett indirett) u li jkunu relatati mal-istat ta' tqala.

NOAEL hi l-abbrevjazzjoni għal-livell bla effett ħażin osservat. Dan hu l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet ħżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minħabba trattament.

Estroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Tossiċità riproduttiva tirrappreżenta l-effetti dannużi fuq il-wild u/jew indeboliment tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel u tan-nisa.

Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

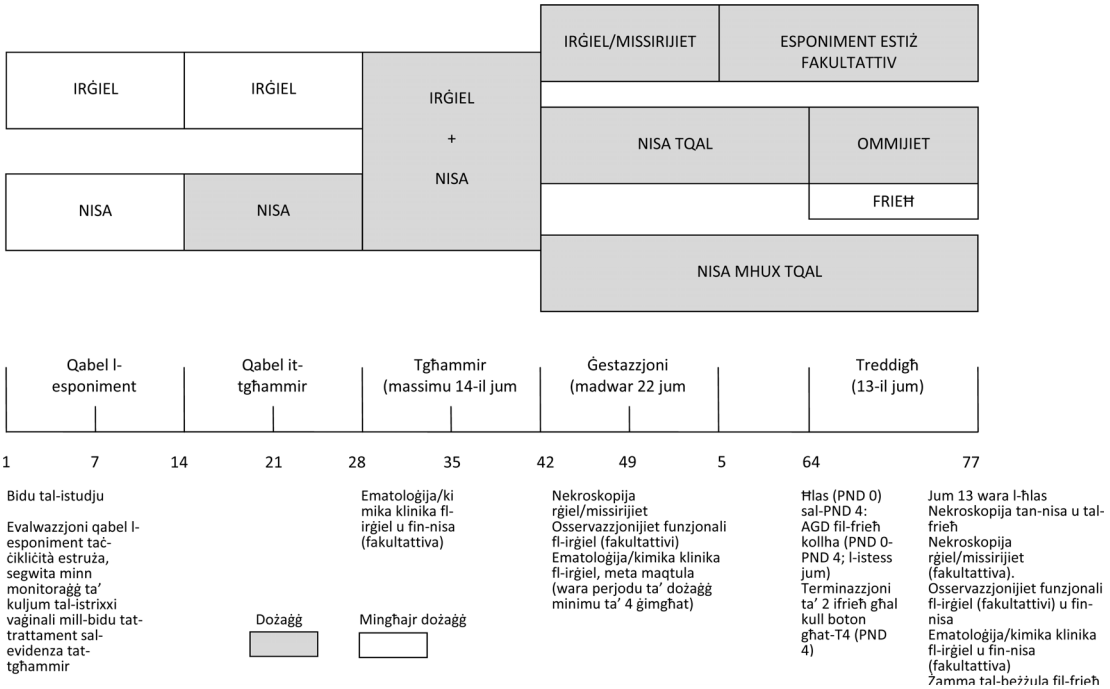
Attività tat-tirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon naturali tat-tirojde (eż. T_3) f'organiżmu mammiferu.

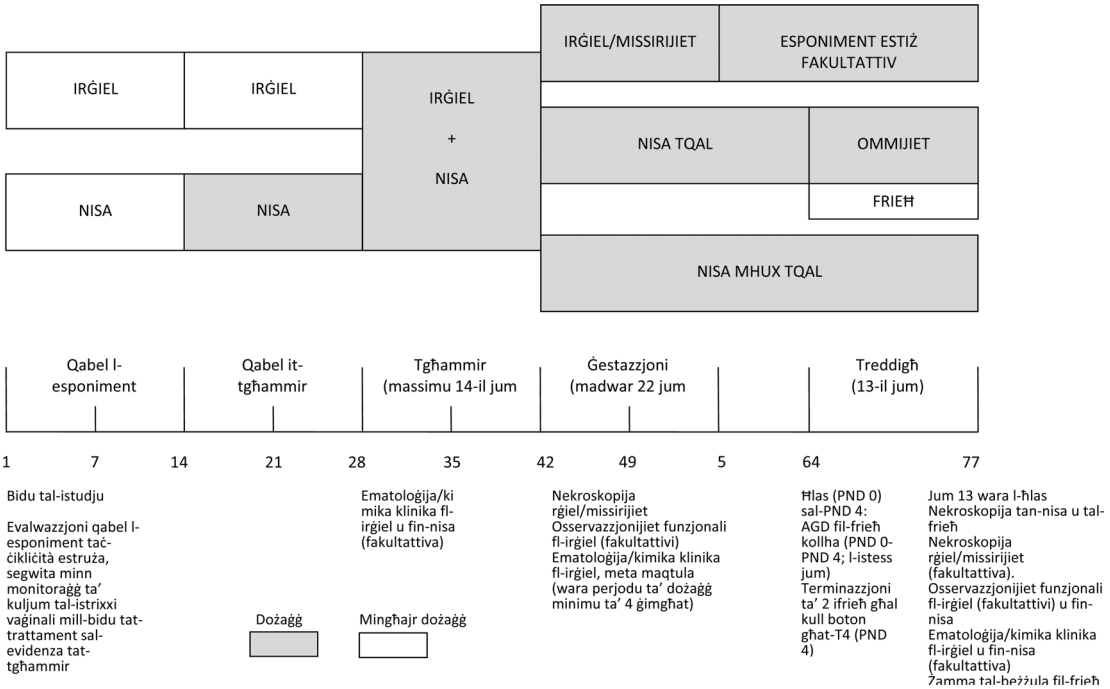
Validazzjoni hi proċess xjentifiku mfassal biex jiġu karatterizzati r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex tintwera l-affidabbiltà u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

▼**M8**

Appendiċi 2

DIJAGRAMMA TAL-ISKEDA SPERIMENTALI, LI TINDIKA D-DURATA MASSIMA TAL-ISTUDJU, FUQ IL-BAŻI TA' PERJODU SĦIĦ TA' TGĦAMMIR FUQ 14-IL JUM





▼**M8**

Appendiċi 3

RAPPORT SOMMARJU TABULARI TAL-EFFETTI FUQ IR-RIPRODUZZJONI/L-IŻVILUPP

OSSERVAZZJONIJIET	Valuri				
Dożaġġ (unitajiet).....	0 (kontroll)	—	—	—	—
Pari mibdija (N)					
Ċiklu estruż (tal-anqas it-tul medju u l-frekwenza taċ-ċikli irregolari)					
Nisa li juru evidenza ta' tgħammir (N)					
Nisa li jilħqu t-tqala (N)					
Jiem tal-konċepiment 1 - 5 (N)					
Jiem tal-konċepiment 6 -...[1] (1) (N)					
Tqala≤21 jum (N)					
Tqala = 22 jum (N)					
Tqala ≥ 23 jum (N)					
Ommijiet b'żgħar ħajjin imwielda (N)					
Ommijiet b'żgħar ħajjin imwielda fil-jum 4 pp (N)					
Impjanti/omm (medja)					
Frieħ ħajjin/omm fit-twelid (medja)					
Frieħ ħajjin/omm fil-jum 4 (medja)					
Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-ħlas (medja)					
Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-boton fil-ħlas (medja)					
Piż tal-boton fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-frieħ fil-ħlas (medja)					
Piż tal-frieħ fil-ħin tal-kejl tal-AGD (medja tal-irġiel, medja tan-nisa)					
AGD tal-frieħ fl-istess jum wara t-twelid, fil-ħlas, fil-jum 4 (medja tal-irġiel, medja tan-nisa, nota tal-PND)					
Piż tal-frieħ fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-frieħ fil-jum 13 (medja)					

▼**M8**

OSSERVAZZJONIJIET	Valuri				
Żamma tal-beżżula tal-frieħ irġiel fil-jum 13 (medja)					
FRIEĦ ANORMALI					
Ommijiet b'0					
Ommijiet b'1					
Ommijiet b'≥ 2					
TELF TAL-ULIED					
Impjantazzjonijiet qabel it-twelid (impjantazzjonijiet nieqes it-twelid ħaj)					
Nisa b'0					
Nisa b'1					
Nisa b'2					
Nisa b'≥ 3					
Wara t-twelid (twelid ħaj nieqes il-ħajjin fil-jum 13 wara t-twelid)					
Nisa b'0					
Nisa b'1					
Nisa b'2					
Nisa b'≥ 3					

([1]) l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir

▼M8

B.65 **METODU TA' TTESTJAR *IN VITRO* TAL-BARRIERA TAL-MEMBRANA GĦALL-KORRUŻJONI TAL-ĠILDA**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 435 tal-OECD (2015). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrożi viżibbli permezz tal-epidermis u fid-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1]) Dan il-metodu ta' ttestjar, ekwivalenti għal-linja gwida aġġornata 435 tal-OECD jipprovdi metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana *in vitro* li jista' jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi korrużivi. Il-metodu ta' ttestjar juża membrana artifiċjali mfassla biex twieġeb għal sustanzi kimiċi korrużivi b'mod simili għall-ġilda tal-annimali *in situ*.

2. Il-korrużività tal-ġilda tradizzjonalment ġiet ivvalutata billi tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test għall-ġilda tal-annimali ħajjin u tiġi vvalutata l-firxa tal-ħsara fit-tessut wara perjodu fiss ta' żmien (2). Minbarra dan il-metodu ta' ttestjar, ġew adottati diversi metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra bħala alternattivi (3)(4) għall-proċedura standard tal-ġilda tal-fniek *in vivo* (Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD) użati biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi korrużivi (2). L-istrateġija ta' ttestjar u ta' evalwazzjoni mqassma fuq saffi tal-GHS tan-NU għall-valutazzjoni u għall-klassifikazzjoni tal-korrużività tal-ġilda u d-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Irritazzjoni/Korrużjoni tal-Ġilda jirrakkomandaw l-użu ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* validati u aċċettati skont il-moduli 3 u 4 (1)(5). L-IATA jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u (i) jipprovdi gwida dwar kif tintegra u tuża *data* eżistenti tat-testijiet u mhux tat-testijiet għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri, inkluż meta jinstabu riżultati negattivi (5). F'dan l-approċċ modulari, ir-riżultati pożittivi mill-metodi ta' ttestjar *in vitro* jistgħu jintużaw biex sustanza kimika tiġi klassifikata bħala korrużiva mingħajr il-ħtieġa ta' ttestjar fuq l-annimali, u b'hekk jitnaqqas u jiġi rfinat l-użu ta' annimali u jiġu evitati l-uġigħ u t-tbatija li jistgħu jseħħu jekk l-annimali jintużaw għal dan l-għan.

3. Tlestew studji ta' validazzjoni għall-mudell tal-barriera tal-membrana *in vitro* kummerċjalment disponibbli bħal Corrositex® (6)(7)(8), li wrew preċiżjoni ġenerali fit-tbassir tal-korrużività tal-ġilda ta' 79 % (128/163), sensittività ta' 85 % (76/89), u speċifiċità ta' 70 % (52/74) għal bażi ta' *data* ta' 163 sustanza u taħlita (7). Fuq il-bażi tal-validità rikonoxxuta tiegħu, dan il-metodu ta' riferiment validat (VRM) ġie rakkomandat biex jintuża bħala parti minn strateġija ta' ttestjar imqassma fuq saffi għall-valutazzjoni tal-potenzjal ta' periklu ta' korrużjoni dermali tas-sustanzi kimiċi (5)(7). Qabel ma mudell ta' barriera tal-membra *in vitro* għall-korrużjoni tal-ġilda jkun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex jiġi żgurat li jkun simili għal dak tal-VRM (9), f'konformità mal-istandards predefiniti tal-prestazzjoni (PS) (10). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu propost ġdid jew

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

▼M8

aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluż fil-linja gwida tat-test ekwivalenti tal-OECD. Bħalissa, metodu *in vitro* wieħed biss hu kopert mil-linja gwida tat-test 435 tal-OECD u dan il-metodu ta' ttestjar, il-mudell disponibbli kummerċjalment Corrositex®.

4. Metodi ta' ttestjar oħra għall-ittestjar tal-korrużività tal-ġilda huma bbażati fuq l-użu ta' ġilda umana rikostitwita (TG 431 tal-OECD) (3) u ta' ġilda ta' firien iżolati (TG 430 tal-OECD) (4). Din il-Linja Gwida tat-Test tipprovdi wkoll għas-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi korrużivi fit-tliet Subkategoriji tal-GHS tan-NU ta' korrużività u t-tliet Gruppi ta' Imballaġġ tat-Trasport tan-NU għall-periklu ta' korrużività. Din il-Linja Gwida tat-Test oriġinarjament ġiet adottata fl-2006 u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tiġi aġġornata l-lista ta' sustanzi ta' profiċjenza.

DEFINIZZJONIJIET

5. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

6. It-test deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test korrużivi u jippermetti s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP (Tabella 1). Barra minn hekk, metodu ta' ttestjar bħal dan jista' jintuża biex jittieħdu deċiżjonijiet dwar il-korrużività u n-nuqqas ta' korrużività ta' klassijiet speċifiċi ta' sustanzi kimiċi, *eż.* l-aċidi organiċi u inorganiċi, id-derivati tal-aċidi ([1]), u bażijiet għal ċerti finijiet ta' ttestjar tat-trasport (7)(11)(12). Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi proċedura ġenerika simili għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat (7). Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD) jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-saħħa (13). Għal evalwazzjoni sħiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermali wieħed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Valutazzjoni tal-Ittestjar (5).

Tabella 1

Il-Kategorija u s-Subkategoriji ta' Korrużivi tal-Ġilda tal-GHS tan-NU (1) ([1])

Kategorija tal-Korrużiv (kategorija 1) (għall-awtoritajiet li ma jużawx is-subkategoriji)	Subkategoriji Potenzjali tal-Korrużiv ([1]) (għall-awtoritajiet li jużaw is-subkategoriji, inkluż ir-Regolament CLP)	Korrużiv f'≥ annimal (1) minn 3	
		Esponiment	Osservazzjoni
Korrużiv	Subkategorija 1A tal-korrużivi	≤ 3 minuti	≤ Siegħa (1)
	Subkategorija 1B tal-korrużivi	> 3 minuti / ≤ siegħa (1)	≤ 14-il jum
	Subkategorija 1C tal-korrużivi	> siegħa (1) / ≤ 4 sigħat	≤ 14-il jum

([1]) Għall-UE, ir-Regolament tas-CLP japplika t-tliet subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-korrużjoni tal-ġilda.

7. Limitazzjoni tal-metodu ta' riferiment validat (7) hi li ħafna sustanzi kimiċi mhux korrużivi u xi sustanzi kimiċi korrużivi jaf ma jikkwalifikawx għall-ittestjar, fuq il-bażi tar-riżultati tat-test tal-kompatibbiltà inizjali

([1]) "Derivattiv tal-aċidu" hu dežinjazzjoni ta' klassi mhux speċifika u hu definit b'mod wiesa' bħala sustanza kimika prodotta minn aċidu b'mod dirett jew inkella b'modifika jew b'sostituzzjoni parzjali. Din il-klassi tinkludi anidridi, aċidi halo, imluħ, u tipi oħra ta' sustanzi kimiċi.

▼M8

(ara l-paragrafu 13). Sustanzi kimiċi milwiema b'pH fil-medda ta' 4,5 sa 8,5 spiss ma jikkwalifikawx għall-ittestjar; madankollu, 85 % tas-sustanzi kimiċi ttestjati f'din il-medda ta' pH ma kinux korrużivi fit-testijiet fuq l-annimali (7). Il-metodu tal-barriera tal-membrana *in vitro* jista' jintuża biex jiġu ttestjati is-solidi (solubbli jew insolubbli fl-ilma), il-likwidi (milwiema jew mhux milwiema), u l-emulsjonijiet. Madankollu, is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jikkawżawx tibdil individwabbli fit-test tal-kompatibbiltà (jiġifieri tibdil fil-kulur fis-Sistema ta' Detezzjoni tas-Sustanzi Kimiċi (CDS) tal-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat) ma jistgħux jiġu ttestjati bil-metodu tal-barriera tal-membrana u għandhhom jiġu ttestjati bl-użu ta' metodi ta' ttestjar oħra.

PRINĊIPJU TAT-TEST

8. Is-sistema tat-test tinkludi żewġ komponenti: bijobarriera makromolekolari sintetika u sistema ta' identifikazzjoni tas-sustanza kimika (CDS); dan il-metodu ta' ttestjar jindividwa permezz tal-barriera tal-membrana tas-CDS il-ħsara kkawżata ms-sustanzi kimiċi tat-test korrużivi wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje tal-barriera tal-membrana makromolekolari sintetika (7), probabbilment bl-istess mekkaniżmu/i ta' korrużjoni li jopera(w) fuq il-ġilda ħajja.

9. Il-penetrazzjoni tal-barriera tal-membrana (jew l-infid) tista' titkejjel b'numru ta' proċeduri jew b'CSD, inkluż tibdil fil-kulur ta' kulur tal-indikatur tal-pH jew f'xi proprjetà oħra tas-soluzzjoni indikatur taħt il-barriera.

10. Il-barriera tal-membrana għandha tkun determinata bħala valida, jiġifieri rilevanti u affidabbli, għall-użu maħsub tagħha. Dan jinkludi l-żgurar li l-preparati differenti jkunu konsistenti fir-rigward tal-proprjetajiet tal-barriera, *eż.* kapaċi jżommu barriera għal sustanzi mhux korrużivi, kapaċi jikkategorizzaw il-proprjetajiet korrużivi tas-sustanzi kimiċi fost id-diversi Subkategoriji ta' korrużività tal-GHS tan-NU (1). Il-klassifikazzjoni assenjata hi bbażata fuq iż-żmien meħud biex sustanza kimika tippenetra minn ġol-barriera tal-membrana sas-soluzzjoni indikatur.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

11. Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu tal-barriera tal-membrana *in vitro*, li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tnax-il Sustanza ta' Profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (10)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1.

Tabella 2

Sustanzi ta' Profiċjenza (1)

Sustanza (2)	CASRN	Klassi Kimika	Subkategorija *In Vivo* tal-GHS tan-NU (3)	Subkategorija *In Vitro* tal-GHS tan-NU (3)
Diidrat tat-trifluworur tal-Boron	13319-75-0	Aċidi inorganiċi	1A	1A
Aċidu nitriku	7697-37-2	Aċidi inorganiċi	1A	1A
Pentaklorur tal-fosfru	10026-13-8	Prekursuri tal-aċidi inorganiċi	1A	1A
Klorur tal-valeril	638-29-9	Kloruri tal-aċidu	1B)	1B)
Idrossidu tas-Sodju	1310-73-2	Bażijiet inorganiċi	1B)	1B)

▼M8

Sustanza ([2])	CASRN	Klassi Kimika	Subkategorija *In Vivo* tal-GHS tan-NU ([3])	Subkategorija *In Vitro* tal-GHS tan-NU ([3])
1-(2-Aminoetil) piperażina	140-31-8	Ammini alifatiċi	1B)	1B)
Klorur tal-benżensulfonil	98-09-9	Kloruri tal-aċidu	1C	1C
N,N-Dimetil benżilammina	103-83-3	Anilini	1C	1C
Tetraetilenpentammina	112-57-2	Ammini alifatiċi	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Nonil akrilat	2664-55-3	Akrilati/metakrilati	NC	NC
Bikarbonat tas-sodju	144-55-8	Imluħ inorganiċi	NC	NC

([1]) It-12-il sustanza elenkati hawn fuq fihom tliet sustanzi minn kull waħda mit-tliet subkategoriji tal-GHS tan-NU għal sustanzi korrużivi u tliet sustanzi mhux korrużivi, huma disponibbli minnufih minghand forniturikummerċjali, u s-subkategorija tal-GHS tan-NU hi bbażata fuq ir-riżultati ta' ttestjar *in vivo* ta' kwalità għolja. Dawn is-sustanzi huma meħuda mil-lista ta' 40 sustanza ta' riferiment li huma inklużi fil-lista minima ta' sustanzi kimiċi identifikati għall-wiri tal-preċiżjoni u tal-affidabbiltà tal-metodi ta' ttestjar li huma strutturalment u funzjonalment simili għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat, u ntgħażlu mill-163 sustanza kimika ta' riferiment li oriġinarjament intużaw biex jiġi vvalidat il-metodu ta' ttestjar ta' riferiment (Corrositex®) (7) (10) (14). L-għan ta' dan il-proċess tal-għażla kien li jinkludi, sa fejn possibbli, sustanzi kimiċi li: kienu rappreżentattivi tal-firxa ta' risposti tal-korrużività (eż. nonkorrużivi; Korrużivi tal-Gruppi tal-Imballaġġ I, II, u III tan-NU) li l-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat kapaċi jkejjel jew ibassar; kienu rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati matul il-proċess ta' validazzjoni; għandhom strutturi kimiċi li kienu definiti sew; induċew riżultati riproduċibbli fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat; induċew riżultati definittivi fit-test ta' riferiment *in vivo*; kienu kummerċjalment disponibbli; u ma kinux assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi (14).

([2]) Sustanzi ttestjati puri jew b'purità ta' ≥ 90 %

([3]) Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għas-Subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU. NC; Mhux korrużivi.

PROĊEDURA

12. Il-paragrafi li ġejjin jiddeskrivu l-komponenti u l-proċeduri ta' metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana artifiċjali għall-valutazzjoni tal-korrużività (7)(15), fuq il-bażi tal-VRM kurrenti, jiġifieri l-Corrositex® kummerċjalment disponibbli. Il-barriera tal-membrana u l-kompatibbiltà/l-indikatur u s-soluzzjonijiet ta' kategorizzazzjoni jistgħu jinbnew, jitħejjew jew jinkisbu kummerċjalment bħal fil-każ tal-VRM Corrositex®. Hu disponibbli protokoll kampjun tal-metodu ta' ttestjar għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat (7). L-ittestjar għandu jsir f'temperatura ambjentali (17-25 °C) u l-komponenti għandhom jikkonformaw mal-kundizzjonijiet li ġejjin.

Test tal-Kompatibbiltà tas-Sustanza Kimika tat-Test

13. Qabel it-twettiq tat-test tal-barriera tal-membrana, isir test tal-kompatibbiltà biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix individwabbli mis-CDS. Jekk is-CDS ma tindividwax is-sustanza kimika tat-test, il-metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana ma jkunx xieraq għall-evalwazzjoni tal-korrużività potenzjali ta' dik is-sustanza kimika tat-test partikolari u għandu jintuża metodu ta' ttestjar differenti. Is-CDS u l-kundizzjonijiet ta' esponiment użati għat-test tal-kompatibbiltà għandhom jirriflettu l-esponiment fit-test tal-barriera tal-membrana sussegwenti.

Test tal-Kategorija tal-Iskala ta' Żmien tas-Sustanza Kimika tat-Test

14. Jekk dan ikun xieraq għall-metodu ta' ttestjar, sustanza kimika tat-test li tkun ġiet kwalifikata mit-test tal-kompatibbiltà għandha tkun soġġetta għal test tal-kategorija tal-iskala ta' żmien, jiġifieri test ta' skrinjar biex issir distinzjoni bejn aċidi jew bażijiet dgħajfa u b'saħħithom. Pereżempju, fil-metodu ta'

▼M8

ttestjar ta’ riferiment validat, test ta’ kategorizzazzjoni tal-iskala ta’ żmien jintuża biex jindika liema miż-żewġ skali ta’ żmien għandha tintuża fuq il-bażi ta’ jekk tiġix individwata riserva aċida jew alkalina sinifikanti. Żewġ skali ta’ żmien tal-infid differenti għandhom jintużaw għad-determinazzjoni tal-korrużività u tas-Subkategorija tal-korrużività tal-ġilda tal-GHS tan-NU, fuq il-bażi tar-riserva aċida jew alkalina tas-sustanza kimika tat-test.

KOMPONENTI TAL-METODU TA’ TTESTJAR TAL-BARRIERA TAL-MEMBRANA

Barriera tal-Membrana

15. Il-barriera tal-membrana tikkonsisti f’żewġ komponenti: ġel milwiem makromolekolari proteiniku u membrana ta’ sostenn permeabbli. Il-ġel proteiniku għandu jkun impermeabbli għal-likwidi u għas-solidi iżda jista’ jġarrab korrużjoni u jsir permeabbli. Il-barriera tal-membrana mibnija bis-sħiħ għandha tinħażen f’kundizzjonijiet predeterminati murija li jipprekludu deterjorament tal-ġel, *eż.* tnixxif, tkabbir mikrobjali, qlib, qsim, li jkunu jiddegradaw il-prestazzjoni tiegħu. Il-perjodu ta’ ħżin aċċettabbli għandu jkun determinat u l-preparati tal-barriera tal-membrana ma għandhomx jintużaw wara dak il-perjodu.

16. Il-membrana ta sostenn permeabbli tipprovdi appoġġ mekkaniku lill-ġel proteiniku matul il-proċess ta’ fformar tal-ġel u l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test. Il-membrana ta’ sostenn għandha tipprevjeni d-dendil jew il-qlib tal-ġel u għandha tkun permeabbli minnufih għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha.

17. Il-ġel proteiniku, kompost minn proteina, *eż.* keratina, kollaġen, jew taħlitiet ta’ proteini, li jifformaw matriċi tal-ġel, iservi bħala l-mira għas-sustanza kimika tat-test. Il-materjal proteiniku jitqiegħed fuq is-superfiċje tal-membrana ta’ sostenn u jitħalla jifforma ġel qabel ma l-barriera tal-membrana titqiegħed fuq is-soluzzjoni indikatur. Il-ġel proteiniku għandu jkun ta’ ħxuna u densità ugwali kullimkien, u mingħajr bżieżaq tal-arja jew difetti li jistgħu jaffettwaw l-integrità funzjonali tiegħu.

Sistema ta’ Detezzjoni tas-Sustanza Kimika (CDS)

18. Is-soluzzjoni indikatur, li hi l-istess soluzzjoni użata għat-test tal-kompatibbiltà, għandha twieġeb għall-preżenza ta’ sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw kolorant indikatur tal-pH jew taħlita ta’ koloranti, *eż.* aħmar krezol u oranġjo metil li juru tibdil fil-kulur, bħala tweġiba għall-preżenza tas-sustanza kimika tat-test. Is-sistema tal-kejl tista’ tkun viżwali jew elettronika.

19. Is-sistemi ta’ detezzjoni li huma żviluppati għad-detezzjoni tal-passaġġ tas-sustanza kimika tat-test mill-membrana barriera għandhom jiġu vvalutati għar-rilevanza u għall-affidabbiltà tagħhom biex tintwera l-firxa ta’ sustanzi kimiċi li jistgħu jiġu individwati u l-limiti kwantitattivi ta’ detezzjoni.

TWETTIQ TAT-TEST

Assemblaġġ tal-Komponenti tal-Metodu ta’ Ttestjar

20. Il-barriera tal-membrana titqiegħed f’kunjett (jew tubu) li fih is-soluzzjoni indikatur biex il-membrana ta’ sostenn tkun f’kuntatt sħiħ mas-soluzzjoni indikatur u mingħajr ebda bużżieqa tal-arja preżenti. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li tinżamm l-integrità tal-barriera.

▼M8

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

21. Ammont xiearq tas-sustanza kimika tat-test, *eż.* 500 µl ta' likwidu jew 500 mg *ta'* solidu mitħun fin (7), jitqiegħed bil-galbu f'saffi fuq is-superfiċje superjuri tal-barriera tal-membrana u jitqassam b'mod ugwali. Numru xieraq ta' repliki, *eż.* erba' (7), jitħejja għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli korrispondenti tagħha (ara l-paragrafi 23 sa 25). Jiġi rreġistrat il-ħin tal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq il-barriera tal-membrana. Biex jiġi żgurat li l-ħinijiet ta' korrużjoni qosra jiġu reġistrati bi preċiżjoni, il-ħinijiet tal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq il-kunjetti tar-repliki jitqassmu fi stadji.

Kejl tal-Penetrazzjonijiet tal-Barriera tal-Membrana

22. Kull kunjett jiġi ssorveljat kif xieraq u l-ħin tal-ewwel tibdil fis-soluzzjoni indikatur, jiġifieri l-penetrazzjoni tal-barriera, jiġi reġistrat, u jiġi determinat il-ħin li jgħaddi bejn l-applikazzjoni u l-penetrazzjoni tal-barriera tal-membrana.

Kontrolli

23. F'testijiet li jinvolvu l-użu ta' veikolu jew ta' solvent bis-sustanza kimika tat-test, il-veikolu jew is-solvent għandhom ikunu kompatibbli mas-sistema tal-barriera tal-membrana, jiġifieri ma jbiddlux l-integrità tas-sistema tal-barriera tal-membrana, u ma għandhomx ibiddlu l-korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Meta applikabbli, kontroll bis-solvent (jew veikolu) għandu jiġi ttestjat fl-istess ħin mas-sustanza kimika tat-test biex tintwera l-kompatibbiltà tas-solvent mas-sistema tal-barriera tal-membrana.

24. Kontroll (korrużiv) pożittiv b'attività ta' korrużività immedjata, *eż.* 110 ± 15 mg idrossidu tas-sodju (Subkategorija Korrużiva 1B tal-GHS tan-NU) (7), għandu jiġi ttestjat fl-istess ħin mas-sustanza kimika tat-test biex jiġi vvalutat jekk is-sistema tat-test hix qed taħdem b'mod aċċettabbli. It-tieni kontroll pożittiv li jkun tal-istess klassi ta' sustanzi kimiċi bħas-sustanza kimika tat-test jista' jkun siewi għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' korrużività relattiv ta' sustanza kimika tat-test korrużiva. Għandu/għandhom jintuża(w) kontroll(i) pożittiv(i) li jkun(u) intermedjarji fil-korrużività tiegħu/-tagħhom (*eż.* is-Subkategorija 1B tal-GHS tan-NU) biex jiġu individwati tibdiliet fil-ħin tal-penetrazzjoni li jistgħu jkunu itwal jew iqsar b'mod inaċ-ċettabbli mill-valur referenzjarju stabbilit, li tkun indikazzjoni li s-sistema tat-test mhix qed taħdem kif suppost. Għal dan l-għan, sustanzi kimiċi estremament korrużivi (Subkategorija 1A tal-GHS tan-NU) jew mhux korrużivi ftit li xejn ikunu utli. Sustanza kimika tas-Subkategorija korrużiva 1B tal-GHS tan-NU tkun tippermetti d-detezzjoni ta' ħin ta' penetrazzjoni rapidu wisq jew bil-mod wisq. Korrużiv dgħajjef (Subkategorija 1C tal-GHS tan-NU) jista' jintuża bħala kontroll pożittiv biex titkejjel il-ħila tal-metodu ta' ttestjar li jiddistingwi b'mod konsistenti bejn sustanzi kimiċi ftit li xejn korrużivi u dawk mhux korrużivi. Indipendentement mill-approċċ użat, għandha tiġi żviluppata medda ta' rispons tal-kontroll pożittiv aċċettabbli fuq il-bażi tal-medda storika tal-ħinijiet ta' penetrazzjoni għall-kontroll(i) pożittiv(i) użat(i), bħal ± 2-3 devjazzjonijiet standard medji. F'kull studju, il-ħin eżatt tal-penetrazzjoni għandu jiġi determinat għall-kontroll pożittiv biex ikunu jistgħu jiġu individwati d-devjazzjonijiet barra l-medda aċċettabbli.

25. Kontroll negattiv (mhux korrużiv), *eż.* 10 % aċidu ċitriku, 6 % aċidu propjoniku (7), ukoll għandu jiġi ttestjat fl-istess ħin mas-sustanza kimika tat-test bħala kejl ieħor tal-kontroll tal-kwalità biex tintwera l-integrità funzjonali tal-barriera tal-membrana.

▼M8

Kriterji ta' Aċċettabbiltà tal-Istudju

26. Skont il-parametri tal-ħin stabbiliti għal kull waħda mis-Subkategoriji tal-korrużività tal-GHS tan-NU, il-ħin (f'minuti) li jgħaddu bejn l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għall-barriera tal-membrana u l-penetrazzjoni tal-barriera jintuża biex titbassar il-korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Biex studju jitqies aċċettabbli, il-kontroll pożittiv konkorrenti għandu jagħti l-ħin ta' rispons tal-penetrazzjoni mistenni (eż. ħin ta' penetrazzjoni ta' 8-16-il min għall-idrossidu tas-sodju jekk jintuża bħala kontroll pożittiv), il-kontroll negattiv konkorrenti ma għandux ikun korrużiv, u, meta jkun inkluż, il-kontroll bis-solvent konkorrenti la għandu jkun korrużiv u lanqas ma għandu jbiddel il-potenzjal ta' korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Qabel ma jużaw b'mod sistematiku xi metodu li jkun konformi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika tagħhom, billi jużaw it-12-il sustanza rrakkomandata fit-Tabella 2. Għal metodi ġodda "me-too" żviluppati fl-ambitu ta' dan il-metodu ta' ttestjar li jkunu strutturalment u funzjonalment simili għall-metodu ta' riferiment validat (14), għandhom jintużaw l-istandards tal-prestazzjoni predefiniti biex jintwerew l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tal-metodu l-ġdid qabel l-użu tiegħu għall-ittestjar regolatorju (10).

Interpretazzjoni tar-Riżultati u tal-Klassifikazzjoni tal-Korrużività tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

27. Il-ħin (f'minuti) li jgħaddi bejn l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għall-barriera tal-membrana u l-penetrazzjoni tal-barriera jintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata f'termini tas-Subkategoriji korrużivi tal-GHS tan-NU (1) u, jekk applikabbli, tal-Grupp tal-Imballaġġ tan-NU (16). Il-valuri tal-ħin ta' limitu għal kull waħda mit-tliet subkategoriji korrużivi huma stabbiliti għal kull metodu ta' ttestjar propost. Id-deċiżjonijiet finali dwar il-ħinijiet ta' limitu għandhom jikkunsidraw il-ħtieġa li tiġi minimizzata s-sottoklassifikazzjoni tal-periklu korrużiv (jiġifieri negattivi foloz). Fil-linja gwida tat-test preżenti, għandhom jintużaw il-ħinijiet ta' limitu ta' Corrositex® kif deskritti fit-tabella 3 peress li dan jirrappreżenta l-uniku metodu ta' ttestjar li bħalissa jaqa' fi ħdan il-linja gwida tat-test (7).

Tabella 3

Mudell ta' tbassir Corrositex®

Ħin medju tal-penetrazzjoni (min.)		Tbassir tal-GHS tan-NU ([3])
Sustanzi kimiċi tat-test tal-kategorija 1 ([1]) (determinati mit-test ta' kategorizzazzjoni tal-metodu)	Sustanzi kimiċi tat-test tal-kategorija 2 ([2]) (determinati mit-test ta' kategorizzazzjoni tal-metodu)	
0-3 min.	0-3 min.	Korrużivi Subkategorija fakultattiva 1A
> 3 sa 60 min.	> 3 sa 30 min.	Korrużivi Subkategorija fakultattiva 1B
> 60 sa 240 min.	> 30 sa 60 min.	Korrużivi Subkategorija fakultattiva 1C
> 240 min.	> 60 min.	Mhux korrużivi

([1]) Sustanzi kimiċi tat-test b'riserva aċida/alkalina għolja (6)
([2]) Sustanzi kimiċi tat-test b'riserva aċida/alkalina baxxa (6)
([3]) Is-subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU jikkorrispondu għall-gruppi tal-imballaġġ I, II u III tan-NU rispettivament

▼**M8**

DATA U RAPPORTAR

Data

28. Il-ħin (f'minuti) li jgħaddi bejn l-applikazzjoni u l-penetrazzjoni tal-barriera għas-sustanza kimika tat-test u l-kontroll(i) pożittiv(i) għandu jiġi rapportat f'forma tabulari bħala *data* dwar ir-replikati individwali, kif ukoll ifisser id-devjazzjoni standard ± għal kull prova.

Rapport tat-Test

29. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tisħin, it-tħin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Veikolu:

— L-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (fejn xieraq), il-volum użat;

— Il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

Il-mudell u l-protokoll tal-barriera tal-membrana in vitro użati, inklużi l-preċiżjoni u l-affidabbiltà murija

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Deskrizzjoni tal-apparat u tal-proċeduri ta' tħejjija użati;

— Sors u kompożizzjoni tal-barriera tal-membrana *in vitro* użati;

— Kompożizzjoni u proprjetajiet tas-soluzzjoni indikatur;

— Metodu ta' detezzjoni;

— Ammonti tas-sustanza kimika tat-test u sustanzi tal-kontroll;

— Numru ta' repliki;

— Deskrizzjoni u ġustifikazzjoni għat-test ta' kategorizzazzjoni tal-iskala ta' żmien;

▼**M8**

— Metodu tal-applikazzjoni;

— Ħinijiet ta' osservazzjoni.

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' klassifikazzjoni applikati;

— Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza.

Ir-riżultati:

— Tabulazzjoni tad-*data* mhux proċessata individwali mit-test u mill-kampjuni tal-kontroll individwali għal kull replikat;

— Deskrizzjonijiet ta' effetti oħra osservati;

— Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, NU New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermali Akuta.

(3) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-ġilda *in vitro*: metodu ta' ttestjar tal-epidermis uman rikostitwit (RHE).

(4) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*. Ir-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. u Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. u Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Assaġġ CORROSITEX® għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda. Il-15-il Laqgħa tal-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC), Ispra, l-Italja. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (l-20 ta' Settembru 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponibbli fuq: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponibbli fuq: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Parti, Kapitolu 2.8), UN, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' 'konkordanza' sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (9).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Sistema ta' Detezzjoni tas-Sustanza Kimika (CDS): Sistema ta' kejl viżwali jew elettronika b'soluzzjoni indikatur li twieġeb għall-preżenza ta' sustanza kimika tat-test, *eż.* b'tibdil f'kolorant indikatur tal-pH, jew f'taħlita ta' koloranti, li juru tibdil fil-kulur bħala tweġiba għall-preżenza tas-sustanza kimika tat-test jew b'tipi oħra ta' reazzjonijiet kimiċi jew elettrokimiċi.

Konkordanza: Dan hu kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (9).

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

IATA: Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

NC: Mhux korrużiva.

Standards tal-prestazzjoni: Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jippruvdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inklużi hemm (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratezza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (9).

▼**M8**

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (9).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (9).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

Korrużjoni tal-ġilda *in vivo*: Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrożi viżibbli mill-*epidermis* u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minħabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopeċja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull additttiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

▼M8

B.66 ASSAĠĠI *IN VITRO* TA' TRANSATTIVAZZJONI TRANSFETTATI B'MOD STABBLI BIEX JIĠU INDIVIDWATI AGONISTI U ANTAGONISTI RIĊETTURI TAL-ESTROĠENU

INTRODUZZJONI ĠENERALI

Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni tal-OECD

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 455 tal-OECD (2016). It-TG 455 hi linja gwida tat-test ibbażata fuq il-prestazzjoni (PBTG), li tiddeskrivi l-metodoloġija ta' Assaġġi *In Vitro* ta' Transattivazzjoni Transfettati b'Mod Stabbli biex jiġu individwati Agonisti u Antagonisti Riċetturi tal-Estroġenu (assaġġi TA tal-ER). Din tinkludi diversi metodi ta' ttestjar mekkanistikament u funzjonalment simili għall-identifikazzjoni tal-agonisti u tal-antagonisti riċetturi tal-estroġenu (jiġifieri ERα, u/jew ERβ) u għandha tiffaċilita l-iżvilupp ta' metodi ta' ttestjar simili jew modifikati ġodda skont il-prinċipji għall-validazzjoni stabbiliti fl-OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). Il-metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ (Appendiċi 2 u Appendiċi 3) li jipprovdu l-bażi għal din il-PBTG huma:

   — L-assaġġ TA Transfettat b'Mod Stabbli (STTA) (2) bl-użu tal-linja ta' ċelloli (h) ERα-HeLa-9903; u

   — L-assaġġ TA tal-ER VM7Luc (3) bl-użu tal-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2 ([1]) li b'mod predominanti jesprimi hERα b'xi kontribuzzjoni minn hERβ(4)(5).

   Għall-iżvilupp u għall-validazzjoni ta' assaġġi simili għall-istess punt ta' tmiem tal-periklu, hemm disponibbli standards tal-prestazzjoni (PS) (6) (7) u dawn għandhom jintużaw. Dawn jippermettu għall-emendar puntwali tal-PBTG 455 biex l-assaġġi simili l-ġodda jkunu jistgħu jiżdiedu ma' PBTG aġġornata; madankollu, assaġġi simili jiżdiedu bis wara rieżami u qbil mill-OECD li ntlaħqu l-istandards tal-prestazzjoni. L-assaġġi inklużi fit-TG 455 jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jiġu indirizzati r-rekwiżiti tal-pajjiżi membri tal-OECD għar-riżultati tat-testijiet dwar it-transattivazzjoni tar-riċettur tal-estroġenu filwaqt li jinkiseb benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD.

Sfond u prinċipji tal-assaġġi inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar

2. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi linji gwida dwar it-testijiet eżistenti, u tiżviluppa ġodda, għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali. Il-qafas kunċettwali (CF) tal-OECD għall-ittestjar u għall-valutazzjoni ta' sustanzi kimiċi

([1]) Qabel Ġunju 2016, din il-linja ta' ċelloli kienet imsejħa l-linja ta' ċelloli BG1Luc. Iċ-ċelloli BG-1 oriġinarjament kienu deskritti minn Geisinger et al. (1998) (35) u aktar tard ġew karatterizzati mir-riċerkaturi fin-National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). B'mod relattivament riċenti, ġie skopert li jeżistu żewġ varjanti differenti taċ-ċelloli BG-1 li jintużaw mir-riċerkaturi, BG-1 Fr u BG-1 NIEHS. Analiżi approfondita, li tinkludi ttestjar tad-DNA, ta' dawn iż-żewġ linji ta' ċelloli varjanti tal-BG-1 saret minn Li u l-kollegi (2014) (37) uriet li l-BG-1 Fr kienet unika u li l-BG-1 NIEHS, jiġifieri l-linja ta' ċelloli oriġinali użata għall-iżvilupp tal-assaġġ, ma kinitx il-linja ta' ċelloli tal-karċinoma ovarjana umana BG1, iżda minflok kienet varjant tal-linja ta' ċelloli tal-kanċer tas-sider uman MCF7. Il-linja ta' ċelloli użata fl-assaġġ, oriġinarjamen imsejħa BG1Luc4E2 (38), issa se tibda tissejjaħ VM7Luc4E2 ("V" = varjant; "M7" = ċelloli MCF7). Bl-istess mod, l-assaġġ issa se jibda jissejjaħ it-TA tal-ER VM7Luc. Filwaqt li dan ibiddel l-oriġini tal-linja ta' ċelloli li fuqha hu bbażat l-assaġġ, dan ma jaffettwax l-istudji ta' validazzjoni ppubblikati u lanqas l-utilità u l-applikazzjoni ta' dan l-assaġġ għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi/antiestroġeniċi.

▼**M8**

interferenti endokrinali potenzjali ġie rivedut fl-2012. Is-CFs oriġinali u riveduti huma inklużi bħala Annessi fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Linji Gwida tat-Testijiet Standardizzati għall-Evalwazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi għall-Interferenza Endokrinali (8). Is-CF jinkludi ħames livelli, b'kull livell li jikkorrispondi għal livell differenti ta' kumplessità bijoloġika. L-assaġġi tat-transattivazzjoni (TA) tal-ER deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar huma l-livell 2, li jinkludi *assaġġi in vitro li jipprovdu data dwar il-mekkaniżmu/i/il-perkors(i) endokrinali magħżula.* Dan il-metodu ta' ttestjar hu għall-assaġġi ta' Transattivazzjoni (TA) *in vitro* mfassla biex jidentifikaw agonisti u antagonisti tar-riċetturi tal-estroġenu (ER).

3. L-interazzjoni tal-estroġeni mal-ERs tista' taffettwa t-traskrizzjoni tal-ġeni kkontrollati mill-estroġenu, li tista' twassal għall-induzzjoni jew għall-inibizzjoni ta' proċessi ċellolari, inklużi dawk neċessarji għall-proliferazzjoni taċ-ċelloli, għall-iżvilupp normali tal-fetu, u għall-funzjoni riproduttiva (9)(10)(11). Il-perturbazzjoni ta' sistemi estroġeniċi normali jista' jkollha l-potenzjal li tiskatta effetti avversi fuq l-iżvilupp normali (ontoġenesi), is-saħħa riproduttiva u l-integrità tas-sistema riproduttiva.

4. L-assaġġi TA *in vitro* huma bbażati fuq interazzjoni diretta jew indiretta tas-sustanzi ma' riċettur speċifiku li jirregola t-traskrizzjoni ta' prodott ta' ġene indikatur. Assaġġi bħal dawn intużaw b'mod estensiv għall-evalwazzjoni tal-espressjoni ġenika regolata minn riċetturi nukleari speċifiċi, bħall-ERs (12) (13) (14) (15) (16). Dawn ġew proposti għad-detezzjoni tat-transattivazzjoni estroġenika regolata mill-ER (17) (18) (19). Hemm tal-anqas żewġ subtipi ewlenin ta' ERs nukleari, α u β, li huma kodifikati minn ġeni distinti. Il-proteini rispettivi għandhom funzjonijiet bijoloġiċi differenti kif ukoll distribuzzjonijiet tat-tessuti u affinitajiet għall-irbit ligandi differenti (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). L-ERα nukleari jimmedja r-rispons estroġeniku klassiku (27)(28)(29)(30), u għalhekk ħafna mill-mudelli li qed jiġu żviluppati bħalissa għall-kejl tal-attivazzjoni jew tal-inibizzjoni atl-ER huma speċifiċi għall-ERα. L-assaġġi jintużaw biex jidentifikaw sustanzi kimiċi li jattivaw (jew jinibixxu) l-ER wara li jsiruleganti ligandi, wara liem il-kumpless riċettur-ligand jillega ma' elementi ta' rispons speċifiċi tad-DNA u jittransattiva ġene indikatur, li jirriżulta f'espressjoni ċellolari akbar ta' proteina markatur. F'dawn l-assaġġi jistgħu jintużaw risponsi indikaturi differenti. F'sistemi bbażati fuq luċiferaži, l-enzima luċiferaži tittrasaforma s-substrat luċiferin fi prodott bijoluminexxenti li jista' jitkejjel b'mod kwantitattiv b'luminometru. Eżempji oħra ta' indikaturi komuni huma proteina fluworexxenti u l-ġene *LacZ*, li jikkodifika l-β-galaktosidaži, enzima li tista' tittrasfroma s-substrat bla kulur X-gal (5- bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranosid) fi prodott blu li jista' jiġi kwantifikat bi spettrofotometru. Dawn l-indikaturi jistgħu jiġu evalwati malajr u mingħajr ma jintefqu wisq flus b'kits tat-test disponibbli kummerċjalment.

5. Studji ta' validazzjoni tal-STTA u l-assaġġi tat-TA VM7Luc urew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tagħhom għall-iskop maħsub tagħhom (3)(4)(5)(30). L-istandards tal-prestazzjoni għal assaġġi TA tal-ER ibbażati fuq il-luminexxenza li jużaw linji ta' ċelloli tas-sider huma inklużi fir-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL® ER (TA tal-ER VM7Luc). Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3). Dawn l-istandards tal-prestazzjoni ġew modifikati biex ikunu applikabbli kemm għall-assaġġi STTA kif ukoll TA VM7Luc (2).

6. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

▼M8

Ambitu u limitazzjonijiet relatati mal-assaġġi TA

7. Dawn l-assaġġi qed jiġu proposti għall-finijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni, iżda jistgħu jipprovdu wkoll informazzjoni mekkanistika li tista' tintuża f'approċċ ta' piż tal-evidenza. Dawn jindirizzaw TA indott b'irbit kimiku mal-ERs f'sistema *in vitro*. B'hekk, ir-riżultati ma għandhomx jiġu estrapolati direttament għas-sinjalar u għar-regolamentazzjoni kumplessi tas-sistema endokrinali intatta *in vivo*.

8. TA medjat mill-ERs jitqies wieħed mill-mekkaniżmi ewlenin tal-interferenza endokrinali (ED), għalkemm hemm mekkaniżmi oħra li bihom tista' sseħħ l-ED, inklużi (i) interazzjonijiet ma' riċetturi u ma' sistemi enzimatiċi oħra fi ħdan is-sistema endokrinali, (ii) sinteżi ormonali, (iii) attivazzjoni metabolika u/jew inattivazzjoni tal-ormoni, (iv) distribuzzjoni tal-ormoni għat-tessuti fil-mira, u (v) tneħħija tal-ormoni mill-ġisem. L-ebda wieħed mill-assaġġi taħt dan il-metodu ta' ttestjar ma jindirizza dawn il-modalitajiet ta' azzjoni.

9. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-ħila tas-sustanzi kimiċi li jattivaw (jiġifieri jaġixxu bħala agonisti) kif ukoll irażżnu (jiġifieri jaġixxu bħala antagonisti) traskrizzjoni dipendenti mill-ER. Ċerti sustanzi kimiċi jistgħu juru, b'mod dipendenti fuq it-tip ta' ċellola, kemm attività agonista kif ukoll antagonista u huma magħrufa bħala modulaturi selettivi tar-riċetturi tal-estroġenu (SERMs). Is-sustanzi kimiċi li huma negattivi f'dawn l-assaġġi jistgħu jiġu evalwati f'assaġġ tal-irbit tal-ER qabel ma jiġi konkluż li s-sustanza kimika ma tillegax mar-riċettur. Barra minn hekk, l-assaġġi aktarx li jinformaw biss dwar l-attività tal-molekola omm fid-dawl tal-kapaċitajiet metabolizzanti limitati tas-sistemi ċellolari *in vitro*. Peress li ntużaw sustanzi singli biss matul il-validazzjoni, l-applikabbiltà għat-taħlitiet tat-test ma ġietx indirizzata. Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda hu teorikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti, ta' UVCBs u ta' taħlitiet. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq sustanza multikostitwenti, UVCB jew taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

10. Għal-finijiet ta' informazzjoni, it-Tabella 1 tipprovdi r-riżultati tat-test tal-agonisti għall-34 sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, 26 huma klassifikati bħala agonisti definittivi tal-ER u tmienja negattivi fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġi *in vitro* għall-irbit mal-ER u t-TA, u/jew l-assaġġ uterotrofiku (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). It-Tabella 2 tipprovdi r-riżultati tat-test tal-antagonisti għall-15-il sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, erbgħa huma klassifikati bħala agonisti definittivi/preżunti tal-ER u 10 negattivi fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġi *in vitro* għall-irbit mal-ER u t-TA (2)(3)(18)(31). B'referenza għad-*data* miġbura fil-qosor fit-Tabella 1 u fit-Tabella 2, kien hemm qbil ta' 100 % bejn iż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment dwar il-klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kollha ħlief sustanza waħda (mifepristone) għall-assaġġ tal-antagonisti, u kull sustanza ġiet klassifikata kif suppost bħala agonist/antagonist tal-ER jew negattiva. Informazzjoni supplimentari dwar dan il-grupp ta' sustanzi kimiċi kif ukoll sustanzi kimiċi addizzjonali ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc matul l-istudji ta' validazzjoni hi pprovduta fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-ERTA (6)(7), fl-Appendiċi 2 (Tabelli 1, 2 u 3).

▼M8

Tabella 1

Harsa ġenerali lejn ir-Riżultati mill-Assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc għas-Sustanzi Ttestjati fiż-Żewġ Assaġġi Agonisti u Klassifikati bħala Agonisti tal-ER (POŻ) jew Negattivi (NEG)

	Sustanza	CASRN	Assaġġ ([1]) STTA			Assaġġ ([2]) TA tal-ER VM7Luc		Sors tad-*Data* għall-Klassifikazzjoni ([4])		
			TA tal-ER Attività	Valur PC_{10} (M)	Valurb PC_{50} ([b]) (M)	Attività TA tal-ER	Valurb,3 EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	TAs ([c]) tal-ER Ohrajn	ER Leganti	Uterotrofiċi
1	17ß-estradjol ([a])	50-28-2	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POŻ	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POŻ (227/227)	POŻ	POŻ
2	17α-estradjol ([a])	57-91-0	POŻ	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POŻ	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POŻ(11/11)	POŻ	POŻ
3	17α-etinil estradjol ([a])	57-63-6	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POŻ	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POŻ(22/22)	POŻ	POŻ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POŻ	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POŻ	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POŻ (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosterone ([a])	434-22-0	POŻ	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POŻ	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POŻ(4/4)	POŻ	POŻ
6	4-kumilfenol ([a])	599-64-4	POŻ	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POŻ	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POŻ(5/5)	POŻ	NT
7	4-*terz*-ottilfenol ([a])	140-66-9	POŻ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POŻ	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POŻ(21/24)	POŻ	POŻ
8	Apiġenin ([a])	520-36-5	POŻ	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POŻ	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POŻ(26/26)	POŻ	NT
9	Atražine ([a])	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A ([a])	80-05-7	POŻ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POŻ	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POŻ (65/65)	POŻ	POŻ
11	Bisfenol B ([a])	77-40-7	POŻ	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POŻ	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POŻ(6/6)	POŻ	POŻ
12	Butilbenżil ftalate ([a])	85-68-7	POŻ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POŻ	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POŻ(12/14)	POŻ	NEG

▼M8

	Sustanza	CASRN	Assaġġ (1) STTA			Assaġġ (2) TA tal-ER VM7Luc		Sors tad-*Data* għall-Klassifikazzjoni (4)		
			TA tal-ER Attività	Valur PC_{10} (M)	Valurb PC_{50} (b) (M)	Attività TA tal-ER	Valurb,3 EC_{50} (b), (3) (M)	TAs (c) tal-ER Ohrajn	ER Leganti	Uterotrofiċi
13	Kortikosterone (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Koumestrol (a)	479-13-0	POŻ	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POŻ	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POŻ(30/30)	POŻ	NT
15	Daidżein (a)	486-66-8	POŻ	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POŻ	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POŻ(39/39)	POŻ	POŻ
16	Dietilstilbestrol (a)	56-53-1	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POŻ	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POŻ(42/42)	POŻ	NT
17	Ftalat tad-di-n-butil	84-74-2	POŻ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POŻ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POŻ(6/11)	POŻ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POŻ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(ebda PC_{50})	POŻ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POŻ		NT
19	Estrone (a)	53-16-7	POŻ	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POŻ	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POŻ(26/28)	POŻ	POŻ
20	Ġenistein (a)	446-72-0	POŻ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POŻ	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POŻ(100/102)	POŻ	POŻ
21	Ħaloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kempferol (a)	520-18-3	POŻ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POŻ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POŻ(23/23)	POŻ	NT
23	Kepone (a)	143-50-0	POŻ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POŻ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POŻ(14/18)	POŻ	NT
24	Ketokonażol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Eżestrol (a)	84-16-2	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POŻ	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POŻ(4/4)	POŻ	NT
27	Metil testosterone (a)	58-18-4	POŻ	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POŻ	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POŻ(5/6)	POŻ	NT

▼M8

	Sustanza	CASRN	Assaġġ ([1]) STTA			Assaġġ ([2]) TA tal-ER VM7Luc		Sors tad-*Data* għall-Klassifikazzjoni ([4])		
			TA tal-ER Attività	Valur PC_{10} (M)	Valurb PC_{50} ([b]) (M)	Attività TA tal-ER	Valurb,3 EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	TAs ([c]) tal-ER Ohrajn	ER Leganti	Uterotrofiċi
28	Morin	480-16-0	POŻ	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POŻ	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POŻ(2/2)	POŻ	NT
29	Noretinodrel ([a])	68-23-5	POŻ	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POŻ	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POŻ(5/5)	POŻ	NT
30	*p,p*'-Metossiklor ([a])	72-43-5	POŻ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(ebda PC_{50}) ()	POŻ	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POŻ(24/27)	POŻ	POŻ
31	Fenobarbital ([a])	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT
32	Reserpina	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Spironolattone ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POŻ	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POŻ	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POŻ(5/10)	POŻ	NT

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; EC_{50} = konċentrazzjoni effettiva medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negatttivi; POŻ = pożittivi; NT = Mhux ittestjati; PC_{10} (u PC_{50}) = il-konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li fiha r-rispons ikun 10 % (jew 50 % għall-PC_{50}) tar-rispons indott mill-kontroll pożittiv (E2, 1nM) f'kull pjastra.

([a]) Sustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati agonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (Rapport ta' Evalwazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc tal-ICCVAM, Tabella 4-1 (3).

([b]) Il-konċentrazzjoni massima ttestjata fin-nuqqas ta' limitazzjonijiet minħabba ċitotossiċità jew insolubbiltà kienet ta' 1×10^{-5} M (Assaġġ STTA) u ta' 1×10^{-3} M (Assaġġ TA tal-ER VM7Luc).

([c]) In-numru fil-parentesi jirrappreżenta r-riżultati tat-test klassifikati bħala pożittivi (POŻ) jew negattivi (NEG) min-numru totali ta' studji referenzjati.

([1]) Valuri rrapportati fl-Abbozz tar-Rapport ta' Prevalidazzjoni u Validazzjoni Interlaboratorji għall-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali (TA) Transfettata biex tiġi Individwata Attività Estroġenika - L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Medjat tar-Reċettur Alfa tal-Estroġenu Uman Bl-Użu tal-Linja Ċelolari hER-HeLa-9903 (2)

([2]) Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL® ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3)

([3]) Il-valuri medji tal-EC_{50} ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

([4]) Klassifikazzjoni bħala agonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-metodi ta' ttestjar tal-Irbit tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Noti: L-ebda assaġġ fi ħdan dan il-metodu ta' ttestjar ma fih l-istess kejlijiet. F'ċerti sitwazzjonijiet, l-EC_{50} ma tkunx tista' tiġi kkalkolata għaliex ma tkunx ġiet ġenerata kurva ta' doża-rispons sħiħa. Filwaqt li bl-assaġġ STTA, il-valur tal-PC_{10} hu kejl importanti, jista' jkun hemm ukoll eżempji oħra li fihom PCx tipprovdi informazzjoni siewja.

▼M8

Tabella 2

Tqabbil tar-Riżultati mill-Assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc għas-Sustanzi Ttestjati fiż-Żewġ Assaġġi Antagonisti u Klassifikati bħala Antagonisti tal-ER (POŻ) jew Negattivi (NEG)

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])		Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])		STTA tal-ER kandidat effetti ([4])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]) (M)	TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
1	4-idrossitamossifen	68047-06-3	POŻ	$3,97 \times 10^{-9}$	POŻ	$2,08 \times 10^{-7}$	POŻ moderati	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
2	Dibenżo[a.h]antraċen	53-70-3	POŻ	Ebda IC_{50}	POŻ	Ebda IC_{50}	POŻ	PP	Kompost Poliċikliku	Sustanza Kimika tal-Laboratorju, Prodott Naturali
3	Mifepriston	84371-65-3	POŻ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	POŻ ħfief	NEG	Sterojde	Farmaċewtiku
4	Ralossifen HCl	82640-04-8	POŻ	$7,86 \times 10^{-10}$	POŻ	$1,19 \times 10^{-9}$	POŻ moderati	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
5	Tamossifen	10540-29-1	POŻ	$4,91 \times 10^{-7}$	POŻ	$8,17 \times 10^{-7}$	POŻ	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
6	17β-estradjol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	NP	NP	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju

▼M8

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])		Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])		STTA tal-ER kandidat effetti ([4])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]) (M)	TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
7	Apiġenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Kompost Eteroċikliku	Kolorant, Prodott Naturali, Intermedjarju Farmaċewtiku
8	Atražina	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	NP	Kompost Eteroċikliku	Erbiċida
9	Ftalat tad-di-n-butil	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, Aċidu Ftaliku	Ingredjent Kożmetiku, Sustanza Kimika Industrijali, Plastifikant
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	mhux ittestjat	NP	Komposti Eteroċikliċi, Pirimidina	Fungiċida
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	NP	NP	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
12	Flutammid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	NP	Ammid	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
13	Ġenisteina	446-72-0	NEG	—	NEG	—	NP	NEG	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku

▼M8

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])		Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])		STTA tal-ER kandidat effetti ([4])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]) (M)	TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	mhux ittestjat	NEG	Fenol	Intermedjarju Kimiku
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	NP	NEG	Idrokarbur (Ċikliku)	Prodott Naturali

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; IC_{50} = konċentrazzjoni inibitorja medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negatttivi; NP = negattivi preżunti; POŻ = pożittivi; PP = pożittivi preżunti.

([a]) Sustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati antagonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (2) (3).

([b]) Il-konċentrazzjoni massima ttestjata fin-nuqqas ta' limitazzjonijiet minħabba ċitotossiċità jew insolubbiltà kienet ta' 1×10^{-3} M (Assaġġ STTA) u ta' 1×10^{-5} M (Assaġġ TA tal-ER VM7Luc).

([1]) Ir-Rapport ta' Validazzjoni tal-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali transfettata b'Mod Stabbli biex tiġi Individwata Attività medjata mill-ER, Parti B (2)

([2]) Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL® ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3).

([3]) Il-valuri medji tal-EC_{50} ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

([4]) Attività STTA tal-ER preżunta mill-effetti rapportati tagħhom magħrufa mid-*data* storika tas-CERI tal-assaġġ dwar l-irbit tar-riċettur tal-ER, l-assaġġ uterotrofiku u l-informazzjoni miġbura mid-dokumentazzjoni disponibbli (2)

([5]) Klassifikazzjoni bħala antagonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbit tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bank ta' *Data* tas-Sustanzi Perikoluż tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER

Komponenti Essenzjali tal-Assaġġ

11. Dan il-metodu ta' ttestjar japplika għal assaġġi li jużaw riċettur tal-ERα transfettat b'mod stabbli jew endoġenu u binja ta' ġene indikatur transfettat b'mod stabbli taħt il-kontroll ta' element ta' rispons tal-estroġenu wieħed jew aktar; madankollu, jistgħu jkunu preżenti riċetturi oħra bħall-ERβ. Dawn huma komponenti essenzjali tal-assaġġ.

Kontrolli

12. Il-bażi għall-istandards referenzjarji konkorrenti proposti għal kull assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti għandha tkun deskritta. Il-kontrolli konkorrenti (negattivi, solvent, u pożittivi), kif xieraq, iservu bħala indikazzjoni li l-assaġġ hu operattiv skont il-kundizzjonijiet tat-test u jipprovdu bażi għal tqabbil bejn esperiment u ieħor; normalment dawn ikunu parti mill-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari (1).

Proċeduri Standard ta' Kontroll tal-Kwalità

13. Il-proċeduri standard ta' kontroll tal-kwalità għandhom jitwettqu kif deskritt għal kull assaġġ biex jiġi żgurat li l-linja ta' ċelloli tibqa' stabbli matul diversi passaġġi, tibqa' ħielsa mill-mikoplażma (jiġifieri ħielsa minn kontaminazzjoni batterjali), u żżomm il-ħila li tipprovdi r-risponsi medjati mill-ER mistennija maż-żmien. Il-linji ta' ċelloli għandhom ikomplu jiġu verifikati għall-identità korretta tagħhom kif ukoll għal kontaminanti oħra (eż. fungi, ħmira u vajrusis).

Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju

14. Qabel l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi mhux magħrufa bi kwalunkwe wieħed mill-assaġġi f'dan il-metodu ta' ttestjar, kull laboratorju għandu juri profiċjenza fl-użu tal-assaġġ. Biex juri l-profiċjenza, kull laboratorju għandu jittestja l-14-il sustanza ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 3 għall-assaġġ tal-agonisti u 10 sustanzi ta' profiċjenza fit-Tabella 4 għall-assaġġ tal-antagonisti. Dan l-ittestjar tal-profiċjenza jikkonferma r-responsività tas-sistema tat-test ukoll. Il-lista ta' sustanzi ta' profiċjenza hi subsett tas-sustanzi ta' riferiment pprovduti fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġi TA tal-ER (6). Dawn is-sustanzi huma kummerċjalment disponibbli, jirrappreżentaw il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi assoċjati komunement mal-attività agonista jew antagonista tal-ER, jesibixxu firxa xierqa ta' potenza mistennija għall-agonisti/antagonisti tal-ER (jiġifieri b'saħħithom sa dgħajfa) u jinkludu negattivi. L-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza għandu jerġa' jsir tal-anqas darbtejn, f'jiem differenti. Il-profiċjenza tintwera bil-klassifikazzjoni korretta (pożittiva/negattiva) ta' kull sustanza ta' profiċjenza. L-ittestjar tal-profiċjenza għandu jerġa' jsir minn kull tekniku meta jkun qed jitgħallem l-assaġġi. Skont it-tip ta' ċellola, uħud minn dawn is-sustanzi ta' profiċjenza jafu jġibu ruħhom bħala SERMs u juru attività kemm bħala agonisti kif ukoll bħala antagonisti. Madankollu, is-sustanzi ta' profiċjenza huma klassifikati fit-Tabelli 3 u 4 skont l-attività predominanti magħrufa tagħhom li għandha tintuża għall-evalwazzjoni tal-profiċjenza.

15. Biex tintwera l-prestazzjoni u għall-finijiet ta' kontroll tal-kwalità, kull laboratorju għandu jiġbor bażijiet ta' *data* storiċi dwar l-agonisti u l-antagonisti bi b'*data* ta' riferiment standard (eż. 17β-estradjol u tamossifen), dwar is-sustanzi kimiċi tal-kontrolli pożittivi u negattivi u dwar il-kontroll bis-solvent (eż. DMSO). Bħala bidu, il-bażi ta' *data* għandha tiġi ġenerata minn tal-anqas 10 sessjonijiet indipendenti tal-agonisti (eż. 17β-estradjol) u 10 sessjonijiet indipendenti tal-antagonisti (eż. tamossifen). Ir-riżultati mill-analiżijiet futuri ta' dawn l-istandards referenzjarji u l-kontrolli bis-solvent għandhom jiżdiedu biex ikabbru l-bażi ta' *data* bl-għan li jiġu żgurati konsistenza u twettiq tal-bijoassaġġ mil-laboratorju matul iż-żmien.

▼M8

Tabella 3

Lista ta' (14) Sustanzi ta' Profiċjenza għall-assaġġ tal-agonisti [1]

Nru [8]	Sustanza	CASRN	Rispons Mistenni [2]	Assaġġ STTA			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc		Klassi Kimika tal-MeSH [6]	Klassi tal-Prodott [7]
				Valur tal-PC_{10} (M) [3]	Valur tal-PC_{50} (M) [3]	Medda ta' Konċ. tat-Test (M)	Valur tal-VM7Luc EC_{50} (M) [4]	L-Oghla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) [5]		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
12	17α-estradjol	57-91-0	POŻ	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
15	*meso*-Eżestrol	84-16-2	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Idrokarbur (Ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
11	4-*terz*-Ottilfenol	140-66-9	POŻ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Intermedjarju Kimiku
9	Ġenisteina	446-72-0	POŻ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
6	Bisfenol A	80-05-7	POŻ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Intermedjarju Kimiku

▼M8

Nru ([8])	Sustanza	CASRN	Rispons Mistenni ([2])	Assaġġ STTA			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc		Klassi Kimika tal-MeSH ([6])	Klassi tal-Prodott ([7])
				Valur tal-PC_{10} (M) ([3])	Valur tal-PC_{50} (M) ([3])	Medda ta' Konċ. tat-Test (M)	Valur tal-VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	L-Ogħla Konċ. ghas-Sejbien tal-Medda (M) ([5])		
2	Kempferolina	520-18-3	POŻ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali
3	Ftalat tal-butilbenżil	85-68-7	POŻ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Aċidu Karbossiliku, Ester, Aċidu Ftaliku	Plastifikant, Sustanza Kimika Industrijali
4	*p*,*p*'- Metossiklor	72-43-5	POŻ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Idrokarbur (Aloġenat)	Pestiċida, Aġent Veterinarju
1	Etil paraben	120-47-8	POŻ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Aċidu Karbossiliku, Fenol	Farmaċewtiku, Preservattiv
17	Atrażina	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Kompost Eteroċikliku	Erbiċida
20	Spironolatton	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Latton, Sterojde	Farmaċewtiku
21	Ketokonażol	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Kompost Eteroċikliku	Farmaċewtiku

▼M8

Nru ([8])	Sustanza	CASRN	Rispons Mistenni ([2])	Assaġġ STTA			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc		Klassi Kimika tal-MeSH ([6])	Klassi tal-Prodott ([7])
				Valur tal-PC_{10} (M) ([3])	Valur tal-PC_{50} (M) ([3])	Medda ta' Konċ. tat-Test (M)	Valur tal-VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	L-Ogħla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) ([5])		
22	Reserpina	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Kompost Etero-ċikliku Indol	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; EC_{50} = konċentrazzjoni effettiva medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negatttivi; POŻ = pożittivi; PC_{10} (u PC_{50}) = il-konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li fiha r-rispons ikun 10 % (jew 50 % għall-PC_{50}) tar-rispons indott mill-kontroll pożittiv (E2, 1nM) f'kull pjastra.

([1]) Klassifikazzjoni bħala pożittiv jew negattiv għal attività agonista tal-ER kienet ibbażata fuq id-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbit tal-ER u AT (31) kif ukoll fuq *data* empirika u informazzjoni oħra miksuba minn studji ta' riferiment ppubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM. (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Valuri rrapportati fl-Abbozz tar-Rapport ta' Prevalidazzjoni u Validazzjoni Interlaboratorji għall-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali (TA) Transfettata biex tiġi Individwata Attività Estroġenika - L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Medjat tar-Reċettur Alfa tal-Estroġenu Uman Bl-Użu tal-Linja Ċelolari hER-HeLa-9903 (30).

([3]) Il-valuri medji tal-EC_{50} ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

([4]) Konċentrazzjonijiet rapportati kienu l-ogħla konċentrazzjonijiet ittestjati (sejbien tal-medda) matul il-validazzjoni tal-Assaġġ TA tal-ER VM7Luc. Jekk il-konċentrazzjonijiet varjaw bejn il-laboratorji, tiġi rrapportata l-ogħla konċentrazzjoni. Ara t-tabella 4-10 tar-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM; Il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-Cell®ER (TA tal-ER VM7Luc): Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3).

([5]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bażi ta' *Data* tas-Sustanzi Perikoluži tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) Mit-Tabella 1 (Lista ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (22) għall-Evalwazzjoni tal-Akkuratezza tal-Agonisti tal-ER) tal-Istandards tal-Prestazzjoni (6)

([8]) Jekk sustanza ta' profiċjenza ma għadhiex kummerċjalment disponibbli, tista' tintuża sustanza bl-istess klassifikazzjoni u b'potenza, b'modalità ta' azzjoni u bi klassi kimika komparabbli.

▼M8

Tabella 4

Lista ta' (10) Sustanzi ta' Proficjenza għall-assaġġ tal-antagonisti

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])			Effetti tal-Kandidat tal-STTA tal-ER ([1])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			Attività TA tal-ER	IC_{50} (M)	Medda ta' Konċ. tat-test (M)	Attività TA tal-ER	IC_{50} ([3]) (M)	L-Oġħla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) ([4])				
1	4-idrossitamossifen	68047-06-3	POŻ	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POŻ	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	POŻ moderati	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
2	Ralossifen HCl	82640-04-8	POŻ	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POŻ	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	POŻ moderati	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
3	Tamossifen	10540-29-1	POŻ	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POŻ	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POŻ	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
4	17β-estradjol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3,67 \times 10^{-3}$	Biex ikunu negattivi (*)	NP	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
5	Apiġenin	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Kompost Eteroċikliku	Kolorant, Prodott Naturali, Intermedjarju Farmaċewtiku
6	Ftalat tad-di-n-butil	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, Aċidu Ftaliku	Ingredjent Kożmetiku, Sustanza Kimika Industrijali, Plastifikant

▼M8

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])			Effetti tal-Kandidat tal-STTA tal-ER ([1])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			Attività TA tal-ER	IC_{50} (M)	Medda ta' Konċ. tat-test (M)	Attività TA tal-ER	IC_{50} ([3]) (M)	L-Ogħla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) ([4])				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	Biex ikunu negattivi (*)	NP	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
8	Ġenisteina	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Biex ikunu negattivi (*)	NEG	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
9	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	mhux ittestjat	NEG	Fenol	Intermedjarju Kimiku
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	Biex ikunu negattivi (*)	NEG	Idrokarbur (Ċikliku)	Prodott Naturali

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; IC_{50} = konċentrazzjoni inibitorja medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negatttivi; NP = negattivi preżunti; POŻ = pożittivi.

(*) klassifikati negattivi skont ir-rieżami tad-dokumentazzjoni (2).

([a]) Sustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati antagonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (2) (3).

([1]) Ir-Rapport ta' Validazzjoni tal-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali transfettata b'Mod Stabbli biex tiġi Individwata Attività medjata mill-ER, Parti B (2)

([2]) Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3).

([3]) Il-valuri medji tal-EC_{50} ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

([4]) Konċentrazzjonijiet rapportati kienu l-ogħla konċentrazzjonijiet ittestjati (sejbien tal-medda) matul il-validazzjoni tal-Assaġġ TA tal-ER VM7Luc. Jekk il-konċentrazzjonijiet varjaw bejn il-laboratorji, tiġi rrapportata l-ogħla konċentrazzjoni. Ara t-tabella 4-11 tar-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM; Il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-Cell®ER (TA tal-ER VM7Luc): Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3).

([5]) Klassifikazzjoni bħala antagonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-metodi ta' ttestjar tal-Irbit tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bank ta' *Data* tas-Sustanzi Perikoluži tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Kriterji ta' Aċċettabbiltà tas-Sessjoni tat-Test

16. Aċċettazzjoni jew rifjut ta' sessjoni tat-test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni tar-riżultati miksuba għall-istandards referenzjarji u għall-kontrolli użati għal kull esperiment. Il-valuri għall-PC_{50} (EC_{50}) jew għall-IC_{50} għall-istandards referenzjarji għandhom jissodisfawi l-kriterji ta' aċċettabbiltà kif previst għall-assaġġ magħżul (għall-STTA ara l-Appendiċi 2, għat-TA tal-ER VM7Luc ara l-Appendiċi 3), u l-kontrolli pożittivi/negattivi kollha għandhom ikunu klassifikati kif suppost għal kull esperiment aċċettat. Il-ħila ta' twettiq tal-assaġġ b'konsistenza għandha tintwera bl-iżvilupp u biż-żamma ta' bażi ta' *data* storika għall-istandards u għall-kontrolli referenzjarji (ara l-paragrafu 15). Id-devjazzjonijiet standard (SD) jew il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni (CV) għall-parametri ta' dħul tal-kurva tal-istandards referenzjarji minn diversi esperimenti jistgħu jintużaw bħala kejl tar-riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju. Barra minn hekk, għandhom jiġu rispettati l-prinċipji li ġejjin rigward il-kriterji ta' aċċettabbiltà:

— Id-*data* għandha tkun biżżejjed għal valutazzjoni kwantitattiva tal-attivazzjoni tal-ER (għall-assaġġ tal-agonisti) jew għat-trażżin tal-ER (għall-assaġġ tal-antagonisti) (jiġifieri l-effikaċja u l-potenza).

— L-attività indikatur medja għall-konċentrazzjoni ta' riferiment tal-estroġenu ta' riferiment għandha tkun tal-anqas il-minimu speċifikat fl-assaġġi fir-rigward ta' dak il-kontroll bil-veikolu (solvent) biex tiġi żgurata sensittività adegwata. Għall-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc, din hi erba' darbiet dik tal-kontroll bil-veikolu medju f'kull pjastra.

— Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom jibqgħu fi ħdan il-medda ta' solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test u ma jurux ċitotossiċità.

Analiżi tad-*data*

17. Il-proċedura definita ta' interpretazzjoni tad-*data* għal kull assaġġ għandha tintuża għall-klassifikazzjoni ta' rispons pożittiv u negattiv.

18. L-ilħuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà (il-paragrafu 16) jindika li l-assaġġ qed jopera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni tat-test partikolari tipproduċi *data* preċiża. Ir-replikar tar-riżultati tal-ewwel sessjoni hu l-aħjar indikazzjoni li tkun ġiet prodotta *data* preċiża. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati riproduċibbli (eż. ir-riżultati taż-żewġ sessjonijiet ta' test jindikaw li sustanza kimika tat-test hi pożittiva), ma hemmx bżonn li ssir it-tielet sessjoni.

19. Jekk żewġ sessjonijiet ma jagħtux riżultati riproduċibbli (eż. sustanza kimika tat-test tkun pożittiva f'sessjoni minnhom u negattiva fis-sessjoni l-oħra), jew jekk ikun meħtieġ grad ogħla ta' ċertezza rigward l-eżitu ta' dan l-assaġġ, tal-anqas għandhom isiru tliet sessjonijiet indipendenti. F'dan il-każ, il-klassifikazzjoni hi bbażata fuq iż-żewġ riżultati konkordanti mit-tlieta.

Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data* Ġenerali

20. Bħalissa ma hemm ebda metodu miftiehem f'livell universali għall-interpretazzjoni tad-*data* tat-TA tal-ER. Madankollu, kemm il-valutazzjonijiet kwalitattivi (eż. pożittivi/negattivi) u/jew kwantitattivi (eż. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) tal-attività medjata bl-ER għandhom ikunu bbażati fuq *data* empirika u ġudizzju xjentifiku solidu. Fejn possibbli, ir-riżultati pożittivi għandhom ikunu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett meta mqabbel mal-kontroll bil-veikolu (solvent) jew mal-estroġen ta' riferiment kif ukoll mill-konċentrazzjoni li fiha jseħħ l-effett (eż. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50}, eċċ.).

▼M8

Rapport tat-Test

21. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Assaġġ:

— l-assaġġ użat;

— il-kontroll/l-istandard referenzjarju/is-sustanza kimika tat-test;

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solvent/Veikolu:

— il-karatterizzazzjoni (natura, fornitur u lott);

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin.

Ċelloli:

— it-tip u s-sors taċ-ċelloli:

  • L-ER hu espress b'mod endoġenu? Jekk le, liema riċettur(i) ġie/ġew transfettat(i)?

  • Il-binja/binjiet indikatur(i) użata/i (inklużi l-ispeċijiet sors);

  • Il-metodu ta' transfezzjoni;

  • Il-metodu tal-għażla għaż-żamma ta' transfezzjoni stabbli (fejn applikabbli);

  • Il-metodu ta' transfezzjoni hu rilevanti għal linji stabbli?

— in-numru ta' passaġġi taċ-ċelloli (mit-taħlil);

▼**M8**

— in-numru ta' passaġġi taċ-ċelloli fit-taħlil;

— il-metodi għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— limitazzjonijiet tas-solubbiltà;

— deskrizzjoni tal-metodi ta' valutazzjoni tal-vijabbiltà applikati;

— komposizzjoni tal-media, konċentrazzjoni tas-CO_2;

— konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— volum tal-veikolu u tas-sustanza kimika tat-test miżjuda;

— it-temperatura tal-inkubazzjoni u l-umdità;

— id-durata tat-trattament;

— id-densità fil-bidu tat-trattament u matulu;

— standards referenzjarji pożittivi u negattivi;

— reaġenti indikaturi (isem tal-prodott, fornitur u lott);

— kriterji biex is-sessjonijiet ta' testijiet jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Kontroll tal-aċċettabbiltà:

— l-induzzjonijiet tad-drabi għal kull pjastra tal-assaġġ u jekk dawn jissodisfawx il-minimu meħtieġ mill-assaġġ fuq il-bażi tal-kontrolli storiċi;

— il-valuri propji għall-kriterji ta' aċċettabbiltà, eż. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ u l-valuri Hillslope, għal kontrolli pożittivi konkorrenti/standards referenzjarji.

Ir-riżultati:

— *data* mhux proċessata u normalizzata;

— il-livell massimu ta' induzzjoni tad-drabi;

— *data* dwar iċ-ċitotossiċità;

— jekk teżisti, l-anqas konċentrazzjoni effettiva (LEC);

— il-valuri RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} u/jew EC_{50}, kif ikun xieraq;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

▼M8

— analiżijiet statistiċi, jekk jeżistu, flimkien ma' kejl tal-errur u tal-kunfidenza (eż. SEM, SD, CV jew 95 % CI) u deskrizzjoni ta' kif inkisbu dawn il-valuri.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. u Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. u Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα*In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. u Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. u Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. u Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET U ABBREVJAZZJONIJIET

Kriterji ta' aċċettabbiltà: L-istandards minimi għat-twettiq tal-kontrolli sperimentali u l-istandards referenzjarji. Il-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha għandhom jiġu ssodisfati biex esperiment jitqies validu.

Akkuratezza (konkordanza): Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-assaġġ u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-assaġġ u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' assaġġ (20).

Agonist: Sustanza li tipproduċi rispons, eż. traskrizzjoni, meta tillega ma' reċettur speċifiku.

Antagonist: Tip ta' ligand ta' reċettur jew ta' sustanza kimika li ma jipprovkax rispons bijoloġiku hu stess meta jillega ma' reċettur, iżda jimblokka jew itaffi risponsi medjati minn agonist.

Attività antiestroġenika: il-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' 17β-estradjol medjata permezz tar-riċetturi tal-estroġenu.

Morfoloġija taċ-ċelloli: Il-forma u d-dehra ta' ċelloli mkabbra f'monosaff fi bwejra waħda ta' pjastra tal-koltura tat-tessuti. Ċelloli li jkunu qed jinxfu spiss juru morfoloġija anormali taċ-ċelloli.

CF: Il-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Evalwazzjoni tal-Interferenti Endorkinali.

Trattament bil-faħam/bid-dekstran: Trattament ta' serum użat f'koltura taċ-ċelloli. Trattament bil-faħam/bid-dekstran (spiss imsejjaħ "strippaġġ") ineħħi l-ormoni endoġeni u l-proteini li jillegaw mal-ormoni.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Ċitotossiċità: Effetti dannużi fl-istruttura jew fil-funzjoni ċellolari li finalment jistgħu jikkawżaw mewt taċ-ċelloli u jistgħu jkunu riflessi bi tnaqqis fin-numru ta' ċelloli preżenti fil-bwejra fi tmiem il-perjodu ta' esponiment jew tnaqqis fil-kapaċità għal kejl ta' funzjoni ċellolari meta mqabbla mal-kontroll b'veikolu konkorrenti.

CV: Koeffiċjent ta' varjazzjoni

DCC-FBS: Serum bovin fetali trattat bil-faħam miksi bid-dekstran.

DMEM: Modifika ta' Dulbecco tal-Medium ta' Eagle

DMSO: Sulfossidu tad-dimetil

E2: 17β-estradjol

EC50: Il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test.

ED: Interferenza endokrinali

hERα: Riċettur alfa tal-estroġenu uman

▼**M8**

hERß: Riċettur beta tal-estroġenu uman

EFM: Medium ħieles mill-estroġenu. Il-Modifika ta' Dulbecco tal-Medium ta' Eagle (DMEM) supplimentat b'4,5 % FBS trattat bil-faħam/bid-dekstran, 1,9 % L-glutammina, u 0,9 % Pen-Strep.

ER: Riċettur tal-Estroġenu

ERE: Element ta' rispons tal-estroġenu

Attività estroġenika: Il-kapaċità ta' sustanza kimika li timita 17β-estradjol fil-ħila tiegħu li jillega ma' riċetturi tal-estroġenu u jattivahom. L-attività estroġenika medjata minn hERα tista' tiġi individwata b'dan il-metodu ta' ttestjar.

ERTA: Trans Attivazzjoni tar-Riċettur tal-Estroġenu

FBS: Serum bovin fetali

HeLa: Linja ta' ċelloli ċervikali umana immortali

HeLa9903: Subklon taċ-ċellola HeLa li fih hERααu ġene indikatur tal-luċiferaży jkunu ġew transfettati b'mod stabbli

IC_{50}: Il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test inibitorja.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl ta' kemm laboraotrji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi, jistgħu jipproduċu riżultati kwalitattivament u kwantitattivament simili. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hi determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm assaġġ jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (1).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jistgħu jirreplikaw b'suċċess ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku f'ħinijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll "riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju" (1).

LEC: L-anqas konċentrazzjoni effettiva hi l-anqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li tipproduċi rispons (jiġifieri l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha l-induzzjoni tad-drabi tkun statistikament differenti mill-kontroll bil-veikolu konkorrenti).

Test me-too: Espressjoni kollokwjali għal assaġġ li jkun strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat u aċċettat. Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili.

MT: Metallotjonein

MMTV: Vajrus tat-Tumur Mammarju fil-Ġrieden

OHT: 4-Idrossitamossifen

PBTG: Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni

▼**M8**

PC (Kontroll pożittiv): sustanza attiva ħafna, idealment 17ß-estradjol, li tkun inkluża fit-testijiet kollha biex tgħin fl-iżgurar ta' funzjonament xieraq tal-assaġġ.

PC_{10}: il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha l-attività mkejla f'assaġġ agonist tkun 10 % tal-attività massima indotta mill-PC (E2 1'fnM għall-assaġġ STTA) f'kull pjastra.

PC_{50}: il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha l-attività mkejla f'assaġġ agonist tkun 50 % tal-attività massima indotta mill-PC (E2 fil-konċentrazzjoni ta' riferiment speċifikata fil-metodu ta' ttestjar) f'kull pjastra.

PC_{Max}: il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi l-RPCMax

Standards tal-prestazzjoni: Standards, ibbażati fuq assaġġ validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' assaġġ propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inkluži hemm (1) il-komponenti essenzjali tal-assaġġ; (2) lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (3) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-assaġġ validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (1).

Sustanzi ta' profiċjenza: Subsett tas-sustanzi ta' riferiment inkluži fl-Istandards tal-Prestazzjoni li jistgħu jintużaw mil-laboratorji biex tintwera kompetenza teknika b'metodu ta' ttestjar standardizzat. Il-kriterji tal-għażla għal dawn is-sustanzi tipikament jinkludu li dawk jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi, ikunu kummerċjalment disponibbli, u jkollhom *data* ta' riferiment ta' kwalità għolja disponibbli.

Profiċjenza: Il-ħila murija biex jitwettaq assaġġ kif suppost qabel l-ittestjar ta' sustanza mhux magħrufa.

Estroġenu ta' riferiment (Kontroll pożittiv, PC): 17β-estradjol (E2, CAS 50-28-2).

Standard ta' riferiment: sustanza ta' riferiment użata biex tintwera l-adegwatezza ta' assaġġ. 17β-estradjol hu l-istandard referenzjarju għall-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc.

Metodi ta' ttestjar ta' riferiment: L-assaġġi li fuqhom hi bbażata PBTG 455.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni ta' assaġġ mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm l-assaġġ għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' assaġġ (1).

Affidabbiltà: Kejl ta' kemm assaġġ jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduttività ta' fost u bejn il-laboratorji.

RLU: Unitajiet tad-Dawl Relattivi

RNA: Aċidu Ribonuklejku

RPC_{Max}: il-livell massimu ta' rispons indott minn sustanza kimika tat-test, espress bħala perċentwal tar-rispons indott minn 1 nM E2 fuq l-istess pjastra

▼M8

RPMI: Medium RPMI 1 640 supplimentat b'0,9 % Pen-Strep u 8,0 % serum bovin fetali (FBS)

Sessjoni: Esperiment individwali li jevalwa l-azzjoni kimika fuq l-eżitu bijoloġiku tal-assaġġ. Kull sessjoni tkun esperiment komplut fuq bwejriet repliki ta' ċelloli pjastrati minn raggruppament komuni ta' ċelloli fl-istess ħin.

Sessjoni indipendenti: Esperiment separat, indipendenti li jevalwa l-azzjoni kiika fuq l-eżitu bijoloġiku tal-assaġġ, bl-użu ta' ċelloli minn raggruppament differenti, sustanzi kimiċi dilwiti friski, imwettaq f'jiem differenti jew fl-istess jum minn persunal differenti.

SD: Devjazzjoni standard.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-assaġġ. Hi kejl tal-preċiżjoni għal assaġġ li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' assaġġ (1).

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal assaġġ li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' assaġġ (1).

Transfezzjoni stabbli: Meta d-DNA jiġi transfettat f'ċelloli kolturati b'tali mod li jiġi integrat b'mod stabbli fil-ġenoma taċ-ċelloli, li jirriżulta fl-espressjoni stabbli ta' ġeni transfettati. Kloni ta' ċelloli transfettati stabbiliment jintgħażlu minn markaturi stabbli (eż. reżistenza għall-G418).

Assaġġ STTA: Assaġġ ta' Transattivazzjoni Transfettata b'Mod Stabbli, l-assaġġ ta' attivazzjoni traskrizzjonali tal-ERα li juża l-Linja ta' Ċelloli HeLa 9 903.

Studju: Il-medda sħiħa ta' ħidma sperimentali mwettqa biex tiġi evalwata sustanza waħda speċifika bl-użu ta' assaġġ speċifiku. Studju jinkludi l-istadji kollha inklużi t-testijiet ta' dilwizzjoni tas-sustanza tat-test fil-media tat-test, sessjonijiet preliminari ta' sejbien tal-medda, is-sessjonijiet komprensivi neċessarji kollha, l-analiżijiet tad-*data*, l-assigurazzjoni tal-kwalità, il-valutazzjonijiet taċ-ċitotossiċità, eċċ. It-tlestija ta' studju tippermetti l-klassifikazzjoni tal-attività tas-sustanza kimika tat-test fuq il-mira ta' tossiċità (jiġifieri attiva, inattiva jew inkonklużiva) li tkun evalwata mill-assaġġ użat u stima tal-potenza relattiva għas-sustanza kimika ta' riferiment pożittiva.

Sustanza: Skont REACH ([1]), sustanza hi definita bħala element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' manifattura, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha. Tintuża definizzjoni simili ħafna fil-kuntest tal-GHS tan-NU (1).

TA (Transattivazzjoni): It-tnedija tas-sinteżi tal-mRNA bħala rispons għal sinjal kimiku speċifiku, bħal irbit ta' estroġenu mar-riċettur tal-estroġenu

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni (ĠU L 304, 22.11.2007, p. 1).

▼M8

Assaġġ: Fi ħdan il-kuntest ta' dan il-metodu ta' ttestjar, assaġġ hu waħda mill-metodoloġiji bħala validi fl-issodisfar tal-kriterji ta' prestazzjoni spjegati. Il-komponenti tal-assaġġ jinkludu, pereżempju, il-linja ta' ċelloli speċifika bil-kundizzjonijiet ta' tkabbir assoċjati, il-media speċifiċi li fihom jitwettaq it-test, il-kundizzjonijiet tal-kompożizzjoni tal-pjastri, l-arranġament u d-dilwizzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test flimkien ma' kwalunkwe miżura ta' kontroll tal-kwalità meħtieġa oħra u l-istadji ta' evalwazzjoni tad-*data* assoċjati.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Traskrizzjoni: Sinteżi tal-mRNA

UVCB: Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti jew Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

Metodu ta' ttestjar validat: Assaġġ li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex tiġi determinata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabli għall-għan propost (1).

Validazzjoni: Il-proċess li bih l-affidabbiltà u r-rilevanza ta' approċċ, ta' metodu, ta' assaġġ, ta' proċess jew ta' valutazzjoni partikolari jkunu stabbiliti għal għan definit (1).

VC (Kontroll bil-veikolu): Is-solvent li jintuża biex jiġu dissolti s-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll jiġi ttestjat unikament bħala veikolu mingħajr sustanza kimika dissolta.

VM7: Ċellola tal-adenokarċinoma immortalizzata li tesprimi b'mod endoġenu r-riċettur tal-estroġenu.

VM7Luc4E2: Il-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2 ġiet derivata miċ-ċelloli tal-adenokarċinoma immortalizzati derivati mill-bniedem VM7 li jesprimu b'mod endoġenu ż-żewġ forom tar-riċettur tal-estroġenu (ERα u ERβ) u ġew transfettati b'mod stabbli bil-plażmid pGudLuc7.ERE. Dan il-plażmid fih erba' kopji ta' oligonukleotid sintetiku li fih l-element ta' rispons tal-estroġenu upstream mill-promotur virali tat-tumur mammarju fil-ġrieden (MMTV) u l-ġene tal-luċiferaži tal-firefly.

Kontroll pożittiv dgħajjef: Sustanza attiva b'mod dgħajjef magħżula mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment li tkun inkluża fit-testijiet kollha biex tgħin fl-iżgurar ta' funzjonament xieraq tal-assaġġ.

▼**M8**

Appendiċi 2

ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RIĊETTUR-A TAL-ESTROĠENU UMAN TRANSFETTAT B'MOD STABBLI GĦAD-DETEZZJONI TA' ATTIVITÀ AGONISTA U ANTAGONISTA TA' SUSTANZI KIMIĊI BL-UŻU TAL-LINJA TA' ĊELLOLI HERA-HELA-9903

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. Dan l-assaġġ tat-transattivazzjoni (TA) juża l-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903 biex jindividwa attività agonista estroġenika medjata permezz tar-riċettur alfa tal-estroġenu uman (hERα). L-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ ta' Transattivazzjoni Transfettata b'Mod Stabbli (STTA) mill-Japanese Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) bl-użu tal-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903 għad-detezzjoni ta' attività agonista u antagonista estroġenika medjata permezz tar-riċettur alfa tal-estroġenu uman (hERα) wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ għall-għan maħsub tiegħu (1).

2. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa TA medjata minn hERα billi jkejjel il-kemiluminexxenza bħala l-punt ta' tmiem. Madankollu, sinjali ta' luminexxenza medjata mhux minn riċettur ġew rapportati f'konċentrazzjonijiet ta' fitoestroġenu ogħla minn 1 μM minħabba l-attivazzjoni eċċessiva tal-ġene indikatur tal-luċiferaži (2) (3). Filwaqt li l-kurva ta' doża - rispons tindika li l-attivazzjoni vera tas-sistema tal-ER isseħħ f'konċentrazzjonijiet inferjuri, l-espressjoni tal-luċiferaži miksuba f'konċentrazzjonijiet ogħla ta' fitoestroġeni jew ta' komposti simili suspettati li jipproduċu attivazzjoni eċċessiva simili għal fitoestroġenu tal-ġene indikatur tal-luċiferaži trid tiġi eżaminata bir-reqqa f'sistemi tal-assaġġ TA tal-ER transfettati b'mod stabbli (Appendiċi 1).

3. Għandhom jinqraw it-taqsimiet "INTRODUZZJONI ĠENERALI" u "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 2.1.

PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

4. L-assaġġ jintuża biex jissenjala rbit tar-riċettur tal-estroġenu ma' ligand. Wara l-irbit mal-ligand, il-kumpless riċettur-ligand jittrażloka għan-nukleu fejn hu jillega elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva ġene indikatur tal-luċiferaži tal-firefly, li jirriżulta f'espressjoni ċellolari miżjuda tal-enzima luċiferaži. Il-luċiferin hu substrat li jiġi trasformat mill-enzima luċiferaži fi prodott tal-bijoluminexxenza li jista' jitkejjel b'mod kwantitattiv b'luminometru. L-attività tal-luċiferaži tista' tiġi evalwata malajr u mingħajr ma jintefqu wisq flus b'numru ta' kits tat-test disponibbli kummerċjalment.

5. Is-sistema tat-test tuża l-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903, li hi derivata minn tumur ċervikali uman, b'żewġ binjiet imdaħħla b'mod stabbli: (i) il-binja tal-espressjoni tal-hERαα(li tikkodifika r-riċettur uman b'tul sħiħ), u (ii) binja indikatur tal-luċiferaži tal-firefly li ġġarrab ħames ripetizzjonijiet tandem ta' Element Risponsiv għall-Estroġenu (ERE) tal-vitelloġenin xprunat minn element TATA promotur tal-metallotjonein (MT) tal-ġrieden. Intwera li l-binja tal-ġene TATA MT tal-ġrieden għandha l-aħjar prestazzjoni, u b'hekk tintuża ta' spiss. Konsegwentement, din il-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903 tista' tkejjel il-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi transattivazzjoni medjata tal-hERα tal-espressjoni ġenika tal-luċiferaži.

▼M8

6. Fil-każ ta' assaġġ tal-agonisti tal-ER, l-interpretazzjoni tad-*data* hi bbażata fuq jekk il-livell ta' rispons massimu indott minn sustanza kimika tat-test jilħaqx jew jaqbiżx rispons tal-agonist ekwivalenti għal 10 % ta' dak indott minn konċentrazzjoni li tinduċi massimalment (1 nM) tal-kontroll pożittiv (PC) 17β-estradjol (E2) (jiġifieri l-PC10). Fil-każ tal-assaġġ tal-antagonisti tal-ER, l-interpretazzjoni tad-*data* hi bbażata fuq jekk ir-rispons jurix tal-anqas tnaqqis ta' 30 % fl-attività mir-rispons indott miż-żieda fil-kontroll (25 pM tal-E2) mingħajr ċitotossiċità. L-analiżi u l-interpretazzjoni tad-*data* huma diskussi fid-dettall fil-paragrafi 34 - 48.

PROĊEDURA

Linja ta' Ċelloli

7. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli hERα-HeLa-9 903 għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli tista' tinkiseb mill-Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank ([1]), wara li jiġi ffirmat Ftehim ta' Trasferiment tal-Materjal (MTA).

8. Fl-ittestjar għandhom jintużaw biss ċelloli karatterizzati bħala ħielsa minn mikoplażma. RT-PCR (Reazzjoni Katina bil-Polimeraży f'Ħin Reali) hi l-metodu tal-għażla għal detezzjoni sensittiva ta' infezzjoni tal-mikoplażma (4) (5) (6).

Stabbiltà tal-linja ta' ċelloli

9. Biex tiġi ssorveljata l-istabbiltà ta' linja ta' ċelloli, E2, 7α-estradjol, 17α-metiltestosterone u kortikosteron għandhom jintużaw bħala l-istandards referenzjarji għall-assaġġ tal-agonisti u kurva sħiħa konċentrazzjoni rispons fil-medda tal-konċentrazzjoni tat-test ipprovduta fit-Tabella 1 għandha titkejjel tal-anqas darba kull darba li jsir l-assaġġ, u r-riżultati għandhom ikunu jaqblu mar-riżultati pprovduti fit-Tabella 1.

10. Fil-każ ta' assaġġ tal-antagonisti, kurvi ta' konċentrazzjoni sħaħ għal żewġ standards referenzjarji, tamossifen u flutammid, għandhom jitkejlu b'mod simultanju ma' kull sessjoni. Il-klassifikazzjoni kwalitattiva korretta bħala pożittiva jew negattiva għaż-żewġ sustanzi kimiċi għandha tiġi ssorveljata.

Koltura taċ-Ċelloli u Kundizzjonijiet tal-Pjastrament

11. Iċ-ċelloli għandhom jinżammu f'Medium Essenzjali Minimu ta' Eagle (EMEM) mingħajr fenol aħmar, supplimentati b'60 mg/l ta' kanamiċina antibijotika u 10 % serum bovin fetali trattat bil-faħam miksi bid-dekstran (DCC-FBS), f'inkubatur tas-CO2 (5 % CO2) f'37±1°C. Malli jilħqu konfluwenza ta' 75-90 %, iċ-ċelloli jistgħu jiġu subkolturati f'10 ml ta' 0,4 x 105 – 1 x 105 ċelloli/ml għal platt tal-koltura taċ-ċelloli ta' 100 mm. Iċ-ċelloli għandhom jiġu sospiżi b'10 % FBS-EMEM (li hu l-istess bħall-EMEM b'DCC-FBS) u mbagħad jiġu pjastrati fi bwejriet ta' mikropjastra f'densità ta' 1 x 104 ċelloli/(100 µl x bwejra). Imbagħad, iċ-ċelloli għandhom jiġu preinkubati f'inkubatur tas-CO2 ta' 5 % f'37°±1°C għal tliet sigħat qabel l-esponiment għas-sustanza kimika. L-oġġetti tal-plastik għandhom ikunu ħielsa minn attività estroġenika.

12. Biex tinżamm l-integrità tar-rispons, iċ-ċelloli għandhom jitkabbru għal aktar minn passaġġ wieħed mill-istokk friżat fil-media kundizzjonata u ma għandhomx jiġu kolturati għal aktar minn 40 passaġġ. Għal-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903, dan ikun anqas minn tliet xhur. Madankollu, il-prestazzjoni taċ-ċelloli tista' tonqos jekk jitkabbru f'kundizzjonijiet ta' koltura mhux adatti.

([1]) JCRB Cell Bank : National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Fax: +81-72-641-9812

▼M8

13. Id-DCC-FBS jista' jitħejja kif deskritt fl-Appendiċi 2.2, jew jinkiseb minn sorsi kummerċjali.

Kriterji ta' aċċettabbiltà

Standards ta' referenza pożittivi u negattivi għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER

14. Qabel u matul l-istudju, ir-risponsività tas-sistema tat-test għandha tiġi verifikata bl-użu tal-konċentrazzjonijiet xierqa ta' estroġenu b'saħħtu: E2, estroġenu dgħajjef (17α-estradjol), agonist dgħajjef ħafna (17α-metiltestosteron), u sustanza negattiva (kortikosteron). Il-valuri tal-medda aċċettabbli miksuba mill-istudju ta' validazzjoni (1) jingħataw fit-Tabella 1. Dawn l-erba' standards referenzjarji konkorrenti għandhom ikunu inklużi ma' kull esperiment u r-riżultati għandhom jaqgħu fi ħdan il-limiti aċċettabbli mogħtija. Jekk dan ma jkunx il-każ, il-kawża għan-nuqqas ta' ssodisfar tal-kriterji ta' aċċettabbiltà għandha tkun determinata (eż. immaniġġjar taċ-ċelloli, u serum u antibijotiċi għall-kwalità u għall-konċentrazzjoni) u l-assaġġ għandu jerġa' jsir. Ladarba jintlaħqu l-kriterji ta' aċċettabbiltà, biex tiġi żgurata varjabbiltà minima tal-valuri tal-EC_{50}, tal-PC_{50} u tal-PC_{10}, hu essenzjali li jsir użu konsistenti mill-materjali għall-kolturar taċ-ċelloli. L-erba' standards referenzjarji konkorrenti, li għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment (imwettqa fl-istess kundizzjonijiet inklużi l-materjali, il-livell tal-passaġġi taċ-ċelloli u t-tekniċi), jistgħu jiżguraw is-sensittività tal-assaġġ għaliex il-PC_{10}s tat-tliet standards referenzjarji pożittivi għandhom jaqgħu fi ħdan il-medda aċċettabbli, u hekk ukoll il-PC_{50}s u l-EC_{50}s fejn jistgħu jiġu kkalkolati (ara t-Tabella 1).

Tabella 1

Il-valuri tal-medda aċċettabbli tal-erba standards referenzjarji għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER

Isem	logPC_{50}	logPC_{10}	logEC_{50}	Pendil ta' Hill	Medda tat-test
17β-estradjol (E2) Nru CAS: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-estradjol Nru CAS: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikosteron Nru CAS: 50-22-6	–	–	–	–	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metiltestosteron Nru CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	–	–	10^{-11}~10^{-5}M

Standards ta' referenza pożittivi u negattivi għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

15. Qabel u matul l-istudju, ir-risponsività tas-sistema tat-test għandha tiġi verifikata bl-użu tal-konċentrazzjonijiet xierqa ta' sustanza pożittiva (Tamossifen), u ta' sustanza negattiva (Flutammid). Il-valuri tal-medda aċċettabbli miksuba mill-istudju ta' validazzjoni (1) jingħataw fit-Tabella 2. Dawn iż-żewġ standards referenzjarji konkorrenti għandhom ikunu inklużi ma' kull esperiment u r-riżultati għandhom jiġu ġġudikati bħala korretti kif muri fil-kriterji. Jekk dan ma jkunx il-każ, il-kawża għan-nuqqas ta' ssodisfar tal-kriterji għandhom ikunu determinati (eż. immaniġġjar taċ-ċelloli, u serum u antibijotiċi għall-kwalità u għall-konċentrazzjoni) u l-assaġġ għandu jerġa' jsir. Barra minn hekk, il-valuri tal-IC_{50} għal sustanza pożittiva (Tamossifen) għandhom jiġu kkalkolati u r-riżultati għandhom jaqgħu fi ħdan il-limiti aċċettabbli mogħtija. Ladarba jintlaħqu l-kriterji ta' aċċettabbiltà, biex tiġi żgurata varjabbiltà minima tal-valuri tal-IC50, hu essenzjali li jsir użu konsistenti mill-materjali għall-kolturar taċ-ċelloli. Iż-żewġ standards referenzjarji konkorrenti, li għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment (imwettaq fl-istess kundizzjonijiet inklużi l-materjali, il-livell tal-passaġġi taċ-ċelloli u tat-tekniċi), jistgħu jiżguraw is-sensittività tal-assaġġ (ara t-Tabella 2).

▼**M8**

Tabella 2

Il-kriterji u l-valuri tal-medda aċċettabbli taż-żewġ standards ta' refrenza għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

Isem	Kriterji	$LogIC_{50}$	Medda tat-test
Tamossifen Nru CAS: 10 540-29-1	Pożittiv: IC50 għandu jiġi kkalkolat	-5,942-7,596	10-10 10-5M
Flutammid Nru CAS: 13 311-84-7	Negattiv: IC30 ma għandux jiġi kkalkolat	-	10-10 10-5M

Kontrolli Pożittivi u Negattivi

16. Il-kontroll pożittiv (PC) għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER (1 nM tal-E2) u għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER (10μM TAM) għandu jiġi ttestjat tal-anqas fi triplikat f'kull pjastra. Il-veikolu li jintuża biex sustanza kimika tat-test tiġi dissolta għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'veikolu (VC) tal-anqas fi triplikat f'kull pjastra. Minbarra dan il-VC, jekk il-PC juża veikolu differenti mis-sustanza kimika tat-test, VC ieħor għandu jiġi ttestjat tal-anqas fi triplikat fuq l-istess pjastra bil-PC.

Kriterji tal-kwalità għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER

17. L-attività medja tal-luċiferaži tal-kontroll pożittiv (1 nM E2) tal-anqas għandha tkun erba' darbiet dik tal-VC medju f'kull pjastra. Dan il-kriterju hu stabbilit fuq il-bażi tal-affidabbiltà tal-valuri tal-punt ta' tmiem mill-istudju ta' validazzjoni (storikament bejn erba' darbiet u 30 darba).

18. Fir-rigward tal-kontroll tal-kwalità tal-assaġġ, l-induzzjoni tad-drabi li tikkorrispondi għall-valur tal-PC10 tal-PC konkorrenti (1 nM E2) għandha tkun akbar minn 1+2SD tal-valur tal-induzzjoni tad-drabi (=1) tal-VC konkorrenti. Għall-finijiet ta' prijoritizzazzjoni, il-valur tal-PC10 jista' jkun siewi biex tiġi simplifikata l-analiżi tad-*data* meħtieġa meta mqabbla ma' analiżi statistika. Għalkemm analiżi statistika tipprovdi informazzjoni dwar is-sinifikat, analiżi bħal din mhix parametru kwantitattiv fir-rigward tal-potenzjal ibbażat fuq il-konċentrazzjoni, u għalhekk hi anqas utli għall-finijiet ta' prijoritizzazzjoni.

Kriterji tal-kwalità għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

19. L-attività medja tal-luċiferaži taż-żieda fil-kontroll (25 pM E2) tal-anqas għandha tkun erba' darbiet dik tal-VC medju f'kull pjastra. Dan il-kriterju hu stabbilit fuq il-bażi tal-affidabbiltà tal-valuri tal-punt ta' tmiem mill-istudju ta' validazzjoni.

20. Fir-rigward tal-kontroll tal-kwalità tal-assaġġ, l-attivazzjoni traskrizzjonali relattiva (RTA) ta' 1 nM E2 għandha tkun akbar minn 100 %, l-RTA ta' 1 μM 4-Idrossitamossifen (OHT) għandha tkun anqas minn 40,6 % u l-RTA ta' 100 μM Diġitonina (Diġ) għandha tkun anqas minn 0 %.

Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f'« KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER» **ta'** dan il-metodu ta' ttestjar).

Veikolu

21. Id-dimetil sulfossidu (DMSO), jew solvent xieraq, fl-istess konċentrazzjoni użata għall-kontrolli pożittivi u negattivi differenti u għas-sustanzi kimiċi tat-test għandu jintuża bħala l-VC konkorrenti. Is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti f'solvent li jissolubilizza dik is-sustanza kimika tat-test u li jitħallat mal-medium taċ-ċelloli. L-ilma, l-etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) u d-DMSO huma veikoli xierqa. Jekk jintuża d-DMSO, il-livell ma għandux jaqbeż iż-0,1 % (v/v). Għal kwalunkwe veikolu, għandu jintwera li l-volum massimu użat mhuwiex ċitotossiku u ma jinterferixxix mat-twettiq tal-assaġġ.

▼M8

Preparazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

22. Ġeneralment, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti fid-DMSO jew f'solvent xieraq ieħor, u jiġu dilwiti serjalment bl-istess solvent fi proporzjon komuni ta' 1:10 biex jitħejjew soluzzjonijiet għad-dilwizzjoni mal-media.

Solubbiltà u Ċitotossiċità: Kunsiderazzjonijiet għas-Sejbien tal-Medda.

23. Għandu jitwettaq test preliminari biex tiġi determinata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa tas-sustanza kimika li tkun se tiġi ttestjata, u biex jiġi żgurat jekk is-sustanza kimika tat-test jistax ikollha xi problemi ta' solubbiltà u ta' ċitotossiċità. Għall-ewwel, is-sustanzi kimiċi jiġu ttestjati sal-konċentrazzjoni massima ta' 1 µl/ml, 1 mg/ml, jew 1 mM, skont liema tkun l-anqas waħda. Fuq il-bażi tal-firxa ta' ċitotossiċità jew tan-nuqqas ta' solubbiltà osservati fit-test preliminari, l-ewwel sessjoni definita għandha tittestja s-sustanza kimika tat-test f'dilwizzjonijiet log-serjali billi tibda bil-konċentrazzjoni aċċettabbli massima (eż. 1 mM, 100µM, 10µM, eċċ.) u tiġi nnotata l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat jew ta' ċitotossiċità. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni, u jekk meħtieġa, fit-tielet sessjoni, għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex jikkaratterizzaw aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons u biex jiġu evitati konċentrazzjonijiet li jinstabu li jkunu insolubbli jew jinduċu ċitotossiċità eċċessiva.

24. Għall-agonisti u għall-antagonisti tal-ER, il-preżenza ta' livelli dejjem akbar ta' ċitotossiċità tista' tbiddel b'mod sinifikanti jew telimina r-rispons sigmojdali tipiku u għandha tiġi kkunsidrata meta tiġi interpretata d-*data*. Għandhom jintużaw metodi ta' ttestjar taċ-ċitotossiċità li jistgħu jipprovdu informazzjoni rigward vijabbiltà ta' 80 % taċ-ċelloli, billi jintuża assaġġ xieraq ibbażat fuq l-esperjenza tal-laboratorju.

25. Jekk ir-riżultati tat-test taċ-ċitotossiċità juru li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test naqqset in-numru ta' ċelloli b'20 % jew aktar, din il-konċentrazzjoni għandha titqies bħala ċitotissika, u l-konċentrazzjonijiet fil-konċentrazzjoni ċitotossika jew ogħla minn din għandhom jiġu eskluż mill-evalwazzjoni.

Esponiment għas-Sustanza Kimika u Organizzazzjoni tal-Pjastra tal-Assaġġ

26. Il-proċedura għad-dilwizzjonijiet kimċi (Stadji 1 u 2) u għall-esponiment għaċ-ċelloli (Stadju 3) tista' titwettaq kif ġej:

Stadju 1: Kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi dilwita serjalment fid-DMSO, jew f'solvent xieraq, u tiżdied mal-bwejriet ta' pjastra għall-mikrotitraġġ biex jinkisbu konċentrazzjonijiet serjali finali kif determinati mit-test preliminari ta' sejbien tal-medda (tipikament f'serje ta', pereżempju, 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, u 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) għall-ittestjar triplikat.

Stadju 2: Dilwizzjoni kimika: L-ewwel issir dilwizzjoni ta' 1,5 µl tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent sa volum ta' 500 µl tal-media.

Stadju 3: Esponiment kimiku taċ-ċelloli: Jiżdiedu 50 µl tad-dilwizzjoni mal-media (imħejjija fl-Istadju 2) fi bwejra tal-assaġġ li jkun fiha 10^4 ċelloli/100 µl/bwejra.

Il-volum finali rakkomandat tal-media meħtieġ għall kull bwejra hu ta' 150 µl. Il-kampjuni tat-test u l-istandards referenzjarji jistgħu jiġu assenjati kif muri fit-Tabella 3 u fit-Tabella 4.

▼M8

Tabella 3

Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tal-istandards referenzjarji fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER

Ring-iela	17α-metiltestosteron			Kortikosteron			17α-estradjol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konċ 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konċ 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konċ 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konċ 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konċ 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konċ 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konċ 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO); PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2)

27. L-istandards referenzjarji (E2, 17α-estradjol, 17-μετιλμτεστοστεροντυυκορτι-κοστερονκκγγανδηομαφιυυττεστφατιαφφκυλλκσεσσφονιοοΤαβελλαTTTTTIl-bwejriet tal-PC trattati b'1 nM ta' E2 li jistgħu jipproduċu induzzjoni massima ta' bwejriet ta' E2 u ta' VC bid-DMSO (jew b'solvent xieraq) waħdu għandhom ikunu inklużi f'kull pjastra tal-assaġġ tat-test (Tabella 4). Jekk fl-istess esperiment jintużaw ċelloli minn sorsi differenti (eż. numru ta' passaġġi differenti, lott differenti, eċċ.), l-istandards referenzjarji għandhom jiġu ttestjati għal kull sors ta' ċelloli.

Tabella 4

Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tas-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll tal-pjastra fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER

Ring-iela	Sustanza Kimika tat-Test 1			Sustanza Kimika tat-Test 2			Sustanza Kimika tat-Test 3			Sustanza Kimika tat-Test 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konċ 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konċ 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konċ 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Ring-iela	Sustanza Kimika tat-Test 1			Sustanza Kimika tat-Test 2			Sustanza Kimika tat-Test 3			Sustanza Kimika tat-Test 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	konċ 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konċ 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konċ 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konċ 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO); PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2)

Tabella 5

Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tal-istandards referenzjarji fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

Ringiela	Tamossifen			Flutammid			Sustanza Kimika tat-Test 1			Sustanza Kimika tat-Test 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konċ 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konċ 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konċ 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konċ 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konċ 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konċ 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Diġ	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO), PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2), OHT :4-Idrossitamossifen, Diġ: Diġitonina.

= miżjuda b'25pM E2

28. Biex tiġi evalwata l-attività antagonista tas-sustanzi kimiċi, il-bwejriet tal-assaġġ li jinsabu fir-ringieli minn A sa G għandhom jiżdiedu b'25pM E2. L-istandards referenzjarji (Tamossifen u Flutammid) għandhom jiġu ttestjati f'kull sessjoni. Bwejriet tal-PC trattati b'1 nM tal-E2 li jistgħu jintużaw bħala kontroll tal-kwalità tal-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903, bwejriet tal-VC trattati bid-DMSO (jew b'solvent xieraq), bwejriet tad-DMSO ta' 0,1 % trattati b'żieda tad-DMSO mal-E2 miżjud li jikkorrispondu għaż-"Żieda fil-kontroll", bwejriet trattati b'konċentrazzjoni finali ta' 1 µM OHT u bwejriet trattati b'100 µM Diġ għandhom ikunu inklużi f'kull pjastra tal-assaġġ tat-test (Tabella 5). Pjastra tal-assaġġ sussegwenti għandha ssegwi l-istess tifsila tal-pjastra mingħajr bwejriet tal-istandards referenzjarji (Tabella 6). Jekk fl-istess esperiment jintużaw ċelloli minn sorsi differenti (eż. numru ta' passaġġi differenti, lott differenti, eċċ.), l-istandards referenzjarji għandhom jiġu ttestjati għal kull sors ta' ċelloli.

▼M8

Tabella 6

Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tas-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll tal-pjastra fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

Ringiela	Sustanza Kimika tat-Test 1			Sustanza Kimika tat-Test 2			Sustanza Kimika tat-Test 3			Sustanza Kimika tat-Test 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konċ 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konċ 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konċ 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konċ 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konċ 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konċ 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Diġ	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO), PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2), OHT: 4-Idrossitamossifen, Diġ: Diġitonina.

: Miżjuda b'25pM E2

29. In-nuqqas ta' effetti tax-xfar għandu jiġi kkonfermat, kif xieraq, u jekk ikun hemm suspett ta' effetti tax-xfar, it-tifsila tal-pjastra għandha tinbidel biex jiġu evitati t-tali effetti. Pereżempju, tista' tintuża tifsila tal-pjastra li teskludi l-bwejriet tax-xfar.

30. Wara li jiżdiedu s-sustanzi kimiċi, il-pjastri tal-assaġġ għandhom ikunu inkubati f'inkubatur tas-CO2 ta' 5 % f'37±1°C għal 20-24 siegħa biex jinduċu l-prodotti tal-ġene indikatur.

31. Se jkollhom bżonn jiġu applikati kunsiderazzjonijiet speċjali għal dawk il-komposti li jkunu volatili ħafna. F'każijiet bħal dawn, il-bwejriet tal-kontroll fil-qrib jistgħu jiġġeneraw pożittivi foloz u dan għandu jiġi kkunsidrat fid-dawl tal-valuri tal-kontroll mistennija u storiċi. Fil-ftit każijiet li fihom il-volatilità tista' tkun ta' ħassib, l-użu ta' "siġillaturi tal-pjastri" jista' jgħin biex jiżola b'mod effettiv il-bwejriet individwali matul l-ittestjar, u għaldaqstant hu rakkomandat f'każijiet bħal dawn.

32. Testijiet definittivi ripetuti għall-istess sustanza kimika għandhom jitwettqu f'jiem differenti, biex tiġi żgurata indipendenza.

Assaġġ tal-luċiferaži

33. Għall-assaġġ jistgħu jintużaw reaġent kummerċjali tal-assaġġ tal-luċiferaži [eż. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, jew ekwivalenti)] jew sistema standard ta' assaġġ tal-luċiferaži (eż. Promega, E1500, jew ekwivalenti), dment li ma jiġux ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà. Ir-reaġenti tal-assaġġ għandhom jintgħażlu fuq il-bażi tas-sensittività tal-luminometru li jkun se jintuża. Meta tintuża s-sistema standard ta' assaġġ tal-luċiferaži, għandu jintuża Reaġent tal-Liżi tal-koltura taċ-Ċeloli (eż. Promega, E1531, jew ekwivalenti) qabel ma jiżdied is-substrat. Ir-reaġent tal-luċiferaži għandu jiġi applikat skont l-istruzzjonijiet tal-manifatturi.

ANALIŻI TAD-*DATA*

Assaġġ tal-agonisti tal-ER

34. Fil-każ tal-assaġġi tal-agonisti tal-ER, biex tinkiseb l-attività traskrizzjonali relattiva għall-PC (1 nM tal-E2), is-sinjali tal-lumenixxenza mill-istess pjastra jistgħu jiġu analizzati skont l-istadji li ġejjin (proċessi matematiċi ekwivalenti oħra huma aċċettabbli wkoll):

Stadju 1. Ikkalkola l-valur medju għall-VC.

▼M8

Stadju 2. Naqqas il-valur medju tal-VC mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3. Ikkalkola l-medja għall-PC normalizzat.

Stadju 4. Iddividi l-valur normalizzat ta' kull bwejra fil-pjastra bil-valur medju tal-PC normalizzat (PC=100 %).

Il-valur finali ta' kull bwejra hu l-attività traskrizzjonali relattiva għal dik il-bwejra meta mqabbla mar-rispons tal-PC.

Stadju 5. Ikkalkola l-valur medju tal-attività traskrizzjonali relattiva għal kull grupp tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Hemm żewġ dimensjonijiet għar-rispons: l-attività traskrizzjonali medja (rispons) u l-konċentrazzjoni li fiha jseħħ ir-rispons (ara t-taqsima li ġejja).

Kunsiderazzjonijiet tal-induzzjoni tal-EC_{50}, tal-PC_{50} u tal-PC_{10}

35. Il-kurva sħiħa konċentrazzjoni rispons hi meħtieġa għall-kalkolu tal-EC50, iżda din mhux dejjem tkun tista' tinkiseb jew prattika minħabba l-limitazzjonijiet tal-medda ta' konċentrazzjoni tat-test (pereżempju minħabba problemi ta' ċitotossiċità jew ta' solubbiltà). Madankollu, peress li l-EC50 u l-livell massimu ta' induzzjoni (li jikkorrispondi għall-ogħla valur tal-ekwazzjoni Hill) huma parametri informattivi, dawn il-parametri għandhom jiġu rapportati fejn possibbli. Għall-kalkolu tal-EC50 u tal-livell ta' induzzjoni massima, għandu jintuża softwer statistiku xieraq (eż. softwer statistiku Graphpad Prism). Jekk l-ekwazzjoni loġistika Hill tkun applikabbli għad-*data* ta' rispons għall-konċentrazzjoni, l-EC50 għandu jiġi kkalkolat bl-ekwazzjoni li ġejja (7):

Y=Qiegħ + (Quċċata-Qiegħ) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x pendil ta' Hill))
Fejn:

X hi l-logaritmu tal-konċentrazzjoni; u,

Y hi r-rispons u Y tibda fil-Qiegħ u titla' sal-Quċċata f'kurva sigmojde. Il-qiegħ hu fiss għal żero fl-ekwazzjoni loġistika Hill.

36. Għal kull sustanza kimika tat-test, għandhom jiġu pprovduti dawn li ġejjin:

L-RPCMax li hu l-livell massimu ta' rispons indott minn sustanza kimika tat-test, espress bħala perċentwal tar-rispons indott minn 1 nM E2 fuq l-istess pjastra, kif ukoll il-PC_{Max} (il-konċentrazzjoni assoċjata mal-RPCMax); u

Għal sustanzi kimiċi pożittivi, il-konċentrazzjonijiet li jinduċu l-PC10 u, jekk xieraq, il-PC50.

37. Il-valur tal-PCx jista' jiġi kkalkolat bl-interpolazzjoni bejn 2 punti fil-koordinat X-Y, wieħed eżatt fuq u l-ieħor eżatt taħt valur tal-PCx. Meta l-punti tad-*data* li jinsabu eżatt fuq u taħt il-valur tal-PCx ikollhom il-koordinati (a,b) u (c,d) rispettivament, il-valur tal-PCx jista' jiġi kkalkolat bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

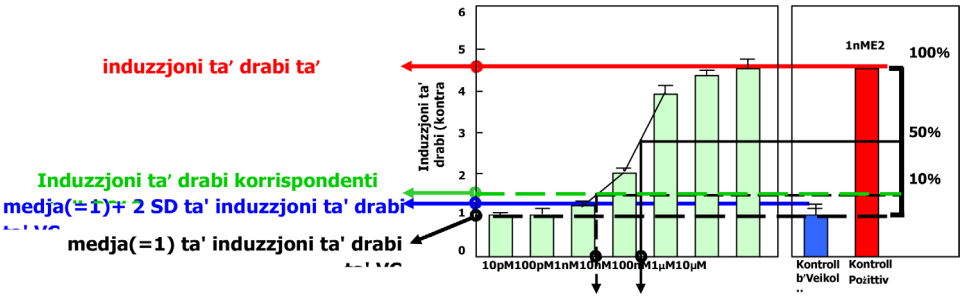
log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

▼M8

38. Deskrizzjonijiet tal-valuri tal-PC huma pprovduti fil-Figura 1 ta' hawn taħt.

Figura 1

Eżempju ta' kif jinkisbu l-valuri tal-PC. Il-PC (1 nM of E2) hi inkluża f'kull pjastra tal-assaġġ



Assaġġ tal-antagonisti tal-ER

39. Fil-każ tal-assaġġi tal-antagonisti tal-ER, biex tinkiseb l-attività traskrizzjonali relattiva (RTA) għaż-żieda fil-kontroll (25 pM tal-E2), is-sinjali tal-lumenixxenza mill-istess pjastra jistgħu jiġu analizzati skont l-istadji li ġejjin (proċessi matematiċi ekwivalenti oħra huma aċċettabbli wkoll):

Stadju 1. Ikkalkola l-valur medju għall-VC.

Stadju 2. Naqqas il-valur medju tal-VC mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*. Stadju 3. Ikkalkola l-medja għaż-żieda normalizzata fil-kontroll.

Stadju 4. Iddividi l-valur normalizzat ta' kull bwejra fil-pjastra bil-valur medju taż-żieda normalizzata fil-kontroll (żieda fil-kontroll=100 %).

Il-valur finali ta' kull bwejra hu l-attività traskrizzjonali relattiva għal dik il-bwejra meta mqabbla mar-rispons taż-żieda fil-kontroll.

Stadju 5. Ikkalkola l-valur medju tal-attività traskrizzjonali relattiva għal kull trattament.

Kunsiderazzjonijiet tal-induzzjoni tal-IC_{30} u tal-IC_{50}

40. Għal sustanzi kimiċi pożittivi, għandhom jiġu pprovduti l-konċentrazzjonijiet li jinduċu l-IC30 u, jekk xieraq, l-IC50.

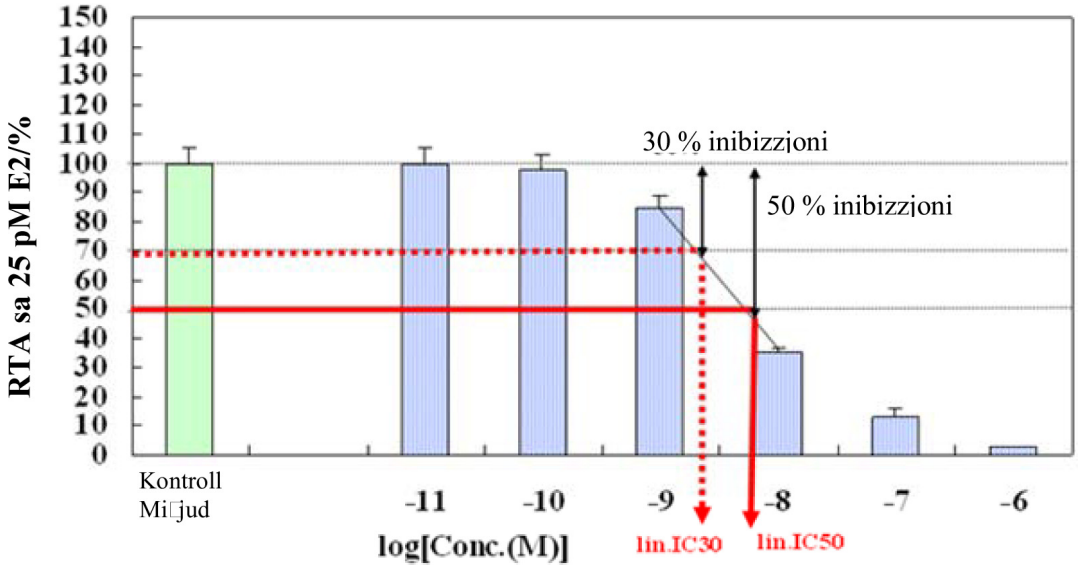
41. Il-valur tal-ICx jista' jiġi kkalkolat bl-interpolazzjoni bejn żewġ punti fil-koordinat X-Y, wieħed eżatt fuq u l-ieħor eżatt taħt valur tal-ICx. Meta l-punti tad-*data* li jinsabu eżatt fuq u taħt il-valur tal-ICx ikollhom il-koordinati (c,d) u (a,b) rispettivament, il-valur tal-ICx jista' jiġi kkalkolat bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

▼M8

Figura 2

Eżempju ta' kif jinkisbu l-valuri tal-IC. Iż-żieda fil-kontroll (25 pM of E2) hi inkluża f'kull pjastra tal-assaġġ



RTA: attività traskrizzjonali relattiva

42. Ir-riżultati għandhom ikunu bbażati fuq żewġ (jew tliet) sessjonijiet indipendenti. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati komparabbli u, għalhekk, riproduċibbli, ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Biex ikunu aċċettabbli, ir-riżultati għandhom:

— Jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (ara l-Kriterji ta' aċċettabbiltà para 14-20),

— Ikunu riproduċibbli.

Il-Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

Tabella 7

Kriterji għal deċiżjonijiet pożittivi u negattivi fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER

Pożittiv	Jekk tinkiseb RPCMax li tkun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons tal-kontroll pożittiv f'tal-anqas tnejn minn żewġ sessjonijiet jew tnejn minn tlieta.
Negattiv	Jekk l-RPCMax ma tilħaqx tal-anqas l-10 % tar-rispons tal-kontroll pożittiv fi tnejn minn żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta.

Tabella 8

Kriterji għal deċiżjonijiet pożittivi u negattivi fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

Pożittiv	Jekk l-IC30 tiġi kkalkolata f'tal-anqas tnejn minn żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta.
Negattiv	Jekk l-IC30 ma tiġix ikkalkolata f'żewġ sessjonijiet minn tnejn jew fi tnejn minn tlieta.

▼**M8**

43. Il-kriterji ta' interpretazzjoni tad-*data* huma murija fit-Tabelli 7 u 8. Ir-riżultati pożittivi jiġu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett kif ukoll mill-konċentrazzjoni li fiha jseħħ l-effett. L-espressjoni tar-riżultati bħala konċentrazzjoni li fiha jintlaħqu 50 % (PC50) jew 10 % (PC10) tal-valuri tal-PC għall-assaġġ tal-agonisti, u 50 % (IC50) jew 30 % (IC30) tal-valur taż-żieda fil-kontroll hi inibita għall-assaġġ tal-antagonisti, u tilħaq dawn iż-żewġ għanijiet. Madankollu, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva, jekk ir-rispons massimu indott mis-sustanza kimika tat-test (RPCMax) ikun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons tal-PC f'tal-anqas tnejn miż-żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta, filwaqt li sustanza kimika tat-test titqies negattiva jekk l-RPCMax ma tilħaqx tal-anqas l-10 % tar-rispons tal-kontroll pożittiv fi tnejn miż-żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta.

44. Il-kalkoli tal-PC10, tal-PC50 u tal-PCMax fl-assaġġ tal-agonisti tal_ER u tal-IC30 u tal-IC50 fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER jistgħu jsiru bl-użu ta' spreadsheet disponibbli mal-Linja Gwida tat-Test fuq is-sit web pubbliku tal-OECD ([1]).

45. Għandu jkun biżżejjed li jinkisbu l-valuri tal-PC10 jew tal-PC50 u tal-IC30 jew tal-IC50 tal-anqas darbtejn. Madankollu, jekk il-linja bażi li tirriżulta għad-*data* fl-istess medda ta' konċentrazzjoni turi varjabbiltà b'koeffiċjent għoli b'mod inaċċettabbli ta' varjazzjoni (CV; %), id-*data* ma tistax titqies affidabbli u s-sors tal-varjabbiltà għolja għandu jiġi identifikat. Is-CV tat-triplikati tad-*data* mhux proċessata (jiġifieri *data* dwar l-intensità tal-luminexxenza) tal-punti ta' *data* li jintużaw għall-kalkolu tal-PC10 għandu jkun anqas minn 20 %.

46. L-ilħuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà jindika li s-sistema tal-assaġġ qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni partikolari tipproduċi *data* preċiża. Id-duplikazzjoni tar-riżultati tal-ewwel sessjoni hi l-aħjar garanzija li tkun ġiet prodotta *data* preċiża.

47. Fil-każ ta' assaġġ tal-agonisti tal-ER, fejn tkun meħtieġa aktar informazzjoni minbarra l-iskopijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni ta' din it-TG għal sustanzi kimiċi tat-test pożittivi, b'mod partikolari għal sustanzi kimiċi PC10-PC49, kif ukoll għal sustanzi kimiċi suspettati li jistimolaw eċċessivament il-luciferaži, jista' jiġi kkonfermat li l-attività osservata tal-lucifera żi hi biss rispons speċifiku għall-ERα, bl-użu ta' antagonist tal-ERα (ara l-Appendiċi 2.1).

RAPPORT TAT-TEST

48. Ara l-paragrafu 20 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER".

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. u Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. u Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼**M8**

Appendiċi 2.1

POŻITTIVI FOLOZ: VALUTAZZJONI TA' SINJALI TAL-LUMINEXXENZA MEDJATI MHUX TAR-RIĊETTUR

1. Pożittivi foloz fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER jistgħu jiġu ġenerati minn attivazzjoni medjata mhux mill-ER tal-ġene luċiferaži, jew minn attivazzjoni diretta tal-prodott ġeniku jew tal-fluworexxenza mhux relatata. Effetti bħal dawn huma indikati minn kurva doża rispons mhux kompluta jew mhux tas-soltu. Jekk it-tali effetti jkunu suspettati, għandu jiġi eżaminat l-effett ta' antagonist tal-ER (eż. 4- idrossitamossifen (OHT) f'konċentrazzjoni mhux tossika) fuq ir-rispons. L-antagonist pur (ICI 1827 80 jaf ma jkunx xieraq għal dan l-għan peress li konċentrazzjoni suffiċjenti ta' ICI 1827 80 tista' tnaqqas il-valur tal-VC, u dan jaffettwa l-analiżi tad-*data*.

2. Biex tiġi żgurata l-validità ta' dan l-approċċ, dawn li ġejjin għandhom jiġu ttestjati fl-istess pjastra:

   — Attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa b'1 010 μM OHT jew mingħajr

   — VC (fi triplikat)

   — OHT (fi triplikat)

   — 1 nM E2 (fi triplikat) bħala PC tal-agonist

   — 1 nM E2 + OHT (fi triplikat)

Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

Nota: Il-bwejriet kollha għandhom ikunu trattati bl-istess konċentrazzjoni tal-veikolu.

— Jekk l-attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa MHIX affettwata mit-trattament bl-antagonist tal-ER, din tiġi klassifikata bħala "Negattiva".

— Jekk l-attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa tkun inibita għalkollox, applika l-kriterji ta' deċiżjoni.

— Jekk l-attività agonistika fl-anqas konċentrazzjoni tkun ekwivalenti għar-rispons tal-PC10 jew aktar minnu, is-sustanza kimika mhux magħrufa tkun inibita b'mod ekwivalenti għar-rispons tal-PC10 jew aktar minnu. Id-differenza fir-risponsi bejn il-bwejriet mhux trattati u dawk trattati bl-antagonist tal-ER hi kkalkolata u din id-differenza għandha titqies bħala r-rispons veru u għandha tintuża għall-kalkolu tal-parametri xierqa biex tkun tista' tittieħed deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni.

Analiżi tad-*data*

Ivverifika l-istandard tal-prestazzjoni.

Ivverifika s-CV bejn il-bwejriet trattati taħt l-istess kundizzjonijiet.

1. Ikkalkola l-medja tal-VC

2. Naqqas il-medja tal-VC mill-valur ta' kull bwejra **mhux** trattata bl-OHT

3. Ikkalkola l-medja tal-OHT

4. Naqqas il-medja tal-VC mill-valur ta' kull bwejra trattata bl-OHT

5. Ikkalkola l-medja tal-PC

6. Ikkalkola l-attività traskrizzjonali relattiva tal-bwejriet l-oħra kollha b'rabta mal-PC.a

▼**M8**

Appendiċi 2.2

PREPARAZZJONI TAS-SERUM TRATTAT B'FAĦAM MIKSI BID-DEKSTRAN (DCC)

1. It-trattament ta' serum b'faħam miksi bid-dekstran (DCC) hu metodu ġenerali għat-tneħħija ta' komposti estroġeniċi mis-serum li jiżdied mal-medium taċ-ċelloli, biex jiġi eskluż ir-rispons preġudikat assoċjat mal-estroġeni residwi fis-serum. B'din il-proċedura jistgħu jiġu trattati 500 ml serum bovin fetali (FBS).

Komponenti

2. Se jkunu meħtieġa l-materjali u t-tagħmir li ġejjin:

Materjali

Faħam attivat

Dekstran:

Eżaidrat tal-klorur tal-manjeżju (MgCl2·6H2O)

Sukrożju

Soluzzjoni mewwieta 1 M HEPES (pH 7,4)

Ilma ultrapur prodott minn sistema ta' filtri

Tagħmir

Kontenitur tal-ħġieġ awtoklavat (id-daqs għandu jiġi aġġustat kif xieraq)
Ċentrifugu tal-Laboratorju Ġenerali (li jista' jissettja t-temperatura għal 4 °C)

Proċedura

3. Il-proċedura li ġejja hi aġġustata għall-użu ta' tubi ċentrifugi tal-50 ml:

[Jum 1] Ħejji s-sospensjoni ta' faħam miksi bid-dekstran b'1 l ilma ultrapur li fih 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sukrożju, 2,5 g faħam, 0,25 g dekstran u 5 mM HEPES u ħawdu f'4 °C, matul il-lejl.

[Jum 2] Iddispensa s-sospensjoni f'tubi ċentrifugi tal-50 ml u ċċentrifuga f'10 000 rpm f'4 °C għal 10 minuti. Neħħi s-supernatant u aħżen nofs is-sediment tal-faħam f'4 °C għall-użu fil-Jum 3. Issospendi n-nofs l-ieħor tal-faħam b'FBS li jkun fih jinħall bil-galbu biex tiġi evitata preċipitazzjoni, u inattivat bis-sħana f'56 °C għal 30 minuta, imbagħad ittrasferixxi f'kontenitur tal-ħġieġ awtoklavat bħal flask Erlenmeyer. Ħawwad din is-sospensjoni bil-galbu f'4 °C, matul il-lejl.

[Jum 3] Iddispensa s-sospensjoni b'FBS f'tubi ċentrifugi għal ċentrifugazzjoni f'10 000 rpm f'4 °C għal 10 minuti. Iġbor l-FBS u ttrasferixxi fis-sediment tal-faħam il-ġdid imħejji u maħżun fil-Jum 2. Issospendi s-sediment tal-faħam u ħawwad din is-sospensjoni bil-galbu f'kontenitur tal-ħġieġ awtoklavat f'4 °C, matul il-lejl.

[Jum 4] Iddispensa s-sospensjoni għaċ-ċentrifugazzjoni f'10 000 rpm f'4 °C għal 10 minuti u sterlizza s-supernatant b'filtazzjoni permezz tal-filtru sterili ta' 0,2 μm. Dan l-FBS trattat bid-DCC għandu jinħażen f'-20 °C u jista' jintuża sa sena.

▼**M8**

Appendiċi 3

ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU VM7LUC GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TAL-AGONISTI U TAL-ANTAGONISTI TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. Dan l-assaġġ juża l-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2 ([1]). Ġie validat min-National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), u mill-Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). Il-linji ta' ċelloli VM7Luc jesprimu b'mod predominanti ERα endoġenu u ammont minuri ta' ERβ endoġenu (2) (3) (4).

2. Dan l-assaġġ hu applikabbli għal firxa kbira ta' sustanzi, dment li ma jkunux jistgħu jiġu dissolti f'sulfossidu tad-dimetil (DMSO; CASRN 67-68-5*)*, ma jirreaġixxux ma' DMSO jew mal-medium tat-tkabbir taċ-ċelloli, u ma jkunux ċitotossiċi fil-konċentrazzjonijiet li jkunu se jiġu ttestjati. Jekk l-użu tad-DMSO ma jkunx possibbli, jista' jintuża veikolu ieħor bħall-etanol jew l-ilma (ara l-paragrafu 12). Il-prestazzjoni murija tal-assaġġ tal-(ant)agonisti TA tal-ER VM7Luc tissuġġerixxi li d-*data* ġenerata b'dan l-assaġġ tista' tinforma mekkaniżmi ta' azzjoni medjati bl-ER u tista' tiġi kkunsidrata għall-prijoritizzazzjoni tas-sustanzi għall-ittestjar ulterjuri.

3. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa TA medjata minn hERα u minn hERß billi jkejjel il-kemiluminexxenza bħala l-punt ta' tmiem. L-użu tal-kemiluminexxenza fil-bijoassaġġi hu mifrux minħabba li l-luminexxenza għandha proporzjon għoli ta' sinjal għall-isfond. Madankollu, l-attività tal-luċiferaži tal-firefly f'assaġġi bbażati fuq ċelloli tista' tiġi konfuża minn sustanzi li jinibixxu l-enzima luċiferaži, u tikkawża inibizzjoni apparenti jew inkella luminexxenza miżjuda minħabba l-istabbilizzazzjoni tal-proteini. Barra minn hekk, f'ċreti assaġġi tal-ġene indikatur tal-ER ibbażati fuq il-luċiferaži, sinjali ta' luminexxenza medjata mhux minn riċettur ġew rapportati f'konċentrazzjonijiet ta' fitoestroġenu ogħla minn 1 μM minħabba l-attivazzjoni eċċessiva tal-ġene indikatur tal-luċiferaži. Filwaqt li l-kurva ta' doża - rispons tindika li l-attivazzjoni vera tas-sistema tal-ER issehħ f'konċentrazzjonijiet inferjuri, l-espressjoni tal-luċiferaži miksuba f'konċentrazzjonijiet ogħla ta' fitoestroġeni jew ta' komposti simili suspettati li jipproduċu attivazzjoni eċċessiva simili għal fitoestroġenu tal-ġene indikatur tal-luċiferaži trid tiġi eżaminata bir-reqqa f'sistemi tal-assaġġ TA tal-ER transfettati b'mod stabbli.

4. Għandhom jinqraw "INTRODUZZJONI ĠENERALI" u "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

([1]) Qabel Ġunju 2016, din il-linja ta' ċelloli kienet imsejħa l-linja ta' ċelloli BG1Luc. Iċ-ċelloli BG-1 oriġinarjament kienu deskritti minn Geisinger et al. (1998) (12) u aktar tard ġew karatterizzati mir-riċerkaturi fin-National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). B'mod relattivament riċenti, ġie skopert li jeżistu żewġ varjanti differenti taċ-ċelloli BG-1 li jintużaw mir-riċerkaturi, BG-1 Fr u BG-1 NIEHS. Analiżi approfondita, li tinkludi ttestjar tad-DNA, ta' dawn iż-żewġ linji ta' ċelloli varjanti tal-BG-1 saret minn Li u l-kollegi (2014) (14) uriet li l-BG-1 Fr kienet unika u li l-BG-1 NIEHS, jiġifieri l-linja ta' ċelloli oriġinali użata għall-iżvilupp tal-assaġġ, ma kinitx il-linja ta' ċelloli tal-karċinoma ovarjana umana BG1, iżda minflok kienet varjant tal-linja ta' ċelloli tal-kanċer tas-sider uman MCF7. Il-linja ta' ċelloli użata fl-assaġġ, oriġinarjamen imsejħa BG1Luc4E2 (15), issa se tibda tissejjaħ VM7Luc4E2 ("V" = varjant; "M7" = ċelloli MCF7). Bl-istess mod, l-assaġġ issa se jibda jissejjaħ it-TA tal-ER VM7Luc. Filwaqt li dan ibiddel l-oriġini tal-linja ta' ċelloli li fuqha hu bbażat l-assaġġ, dan ma jaffettwax l-istudji ta' validazzjoni ppubblikati u lanqas l-utilità u l-applikazzjoni ta' dan l-assaġġ għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi/antiestroġeniċi.

▼M8

PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. L-assaġġ jintuża biex jindika l-irbit tal-ligand tal-ER, segwit minn traslokazzjoni tal-kumpless riċettur-ligand għan-nukleu. Fin-nukleu, il-kumpless riċettur-ligand jillega ma' elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva l-ġene rapportatur (*luc*), li jirriżulta fil-produzzjoni ta' luċiferaži u fl-emissjoni sussegwenti tad-dawl, li tista' tiġi kwantifikata bl-użu ta' luminometru. L-attività tal-luċiferaži tista' tiġi evalwata malajr u mingħajr ma jintefqu wisq flus b'numru ta' kits disponibbli kummerċjalment. It-TA tal-ER VM7Luc juża linja ta' ċelloli tal-adenokarċinoma tas-sider uman risponsiva għall-ER, VM7, li ġiet transfettata b'mod stabbli b'binja indikatur tal-*luc* tal-firefly taħt il-kontroll ta' erba' elementi ta' rispons tal-estroġenu mqiegħda upstream mill-promotur tal-vajrus tat-tumur mammarju tal-ġrieden (MMTV), biex jiġu identifikati sustanzi b'attività agonista jew antagonista tal-ER *in vitro*. Dan il-promotur tal-MMTV jesibixxi biss reattività inkroċjata minuri ma' ormoni sterojde u mhux sterojde oħrajn (8). Il-kriterji għall-interpretazzjoni tad-*data* huma deskritti fid-dettall fil-paragrafu 41. Fil-qosor, rispons pożittiv jiġi identifikat minn kurva konċentrazzjoni rispons li jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba (medja ± SD), kif ukoll tibdil fl-amplitudni (unità tad-dawl relattiva normalizzata [RLU]) ta' tal-anqas 20 % tal-valur massimali għall-istandard referenzjarju (17β-estradjol [E2; CASRN 50-28-2] għall-assaġġ tal-agonisti, raloksifen HCl [Ral; CASRN 84 449-90-1]/E2 għall-assaġġ tal-antagonisti).

PROĊEDURA

Linja ta' Ċelloli

6. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli VM7Luc4E2 għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli bħalissa hi disponibbli biss bi ftehim ta' liċenzjar tekniku mill-University of California, Davis, California, l-Istati Uniti ([1]), u minn Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, l-Istati Uniti ([2]).

Stabbiltà tal-Linja ta' Ċelloli

7. Biex jinżammu l-istabbiltà u l-integrità tal-linja ta' ċelloli, iċ-ċelloli għandhom jitkabbru għal aktar minn passaġġ wieħed mill-istokk friżat fil-media ta' żamma taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 9). Iċ-ċelloli ma għandhomx jiġu kolturati għal aktar minn 30 passaġġ. Għal-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2, 30 passaġġ se jkunu bejn wieħed u ieħor tliet xhur.

Koltura taċ-Ċelloli u Kundizzjonijiet tal-Pjastrament

8. Il-proċeduri speċifikati fil-Gwida dwar Prattika Tjaba tal-Koltura taċ-Ċelloli (5) (6) għandhom jiġu segwiti biex tiġi żgurata l-kwalità tal-materjali u tal-metodi kollha biex jinżammu l-integrità, il-validità u r-riproduċibbiltà ta' kwalunkwe ħidma mwettqa.

9. Iċ-ċelloli VM7Luc4E2 jinżammu f'medium RPMI 1 640 supplimentat b'0,9 % Pen-Strep u bi 8,0 % serum bovin fetali (FBS) f'inkubatur tal-koltura tat-tessuti dedikat f'37°C ± 1°C, 90 % ± 5 % umdità, u f'5,0 % ± 1 % CO_2/arja.

10. Malli jilħqu konfluwenza ta' ~80 %, iċ-ċelloli VM7Luc4E2 jiġu subkolturati u kundizzjonati għal ambjent ħieles minn estroġenu għal 48 siegħa qabel il-pjastrament taċ-ċelloli fi pjastri b'96 bwejra għall-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test u għall-analiżi tal-induzzjoni dipendenti mill-estroġenu tal-attività ta' luċiferaži. Il-medium ħieles mill-estroġenu (EFM) fih Modifika

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, posta elettronika: info@dioxins.com, Telefown: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404

▼M8

ta’ Dulbecco tal-Medium ta’ Eagle (DMEM) mingħajr fenol aħmar, supplimentat b’4,5 % FBS trattat bil-faħam/bid-dekstran, 1,9 % L-glutammina, u 0,9 % Pen-Strep. Kull oġġett tal-plastik għandu jkun ħieles minn attività estroġenika [ara l-protokoll dettaljat (7)].

Kriterji ta’ Aċċettabbiltà

11. L-aċċettazzjoni jew ir-rifjut ta’ test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni ta’ standard referenzjarju u r-riżultati tal-kontroll minn kull esperiment imwettaq fi pjastra b’96 bwejra. Kull standard referenzjarju jiġi ttestjat f’konċentrazzjonijiet multipli u hemm diversi kampjuni ta’ kull konċentrazzjoni ta’ referenza u ta’ kontroll. Ir-riżultati jitqabblu mal-kontrolli tal-kwalità (QC) għal dawn il-parametri li ġew derivati mill-bażijiet ta’ *data* storiċi dwar l-agonisti u l-antagonisti ġenerati minn kull laboratorju matul il-wiri tal-profiċjenza. Il-bażijiet ta’ *data* storiċi huma aġġornati b’valuri tal-istandards referenzjarji u tal-kontroll fuq bażi kontinwa. Tibdiliet fit-tagħmir jew fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju jistgħu jesiġu ġenerazzjoni ta’ bażijiet ta’ *data* storiċi aġġornati.

Test tal-Agonisti

Test għas-Sejbien tal-Medda

- Induzzjoni: L-induzzjoni tal-pjastri għandha titkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-unità tad-dawl relattiva (RLU) tal-istandard referenzjarju E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO. Normalment tinkiseb induzzjoni għal ħames darbiet, iżda għall-fini ta’ aċċettazzjoni, l-induzzjoni għandha tkun ekwivalenti għal erba’ darbiet jew aktar.

- Riżultati tal-kontroll bid-DMSO: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b’solvent għandhom ikunu fi ħdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b’solvent.

- Esperiment li jonqos milli jilħaq wieħed mill-kriterji ta’ aċċettazzjoni għandu jiġi injorat u ripetut.

Test Komprensiv

Dan jinkludi l-kriterji ta’ aċċettabbiltà mit-test tas-sejba tal-medda tal-agonisti u dawn li ġejjin:

- Ir-riżultati tal-istandards referenzjarji: Il-kurva konċentrazzjoni rispons tal-istandard referenzjarju E2 għandha tkun ta’ forma sigmojde u jkollha tal-anqas tliet valuri fi ħdan it-taqsima lineari tal-kurva konċentrazzjoni rispons.

- Riżultati tal-kontroll pożittiv: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b’metossiklor għandhom ikunu akbar mill-medja tad-DMSO flimkien ma’ tliet darbiet id-devjazzjoni standard mill-medja tad-DMSO.

- Esperiment li jonqos milli jilħaq xi wieħed mill-kriterji ta’ aċċettazzjoni għandu jiġi injorat u ripetut.

Test tal-Antagonisti

Test għas-Sejbien tal-Medda

- Tnaqqis: It-tnaqqis tal-pjastri jitkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-RAL/tal-istandard referenzjarju tal-E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO. Normalment jinkiseb tnaqqis ta’ ħames darbiet, iżda għall-finijiet ta’ aċċettazzjoni, it-tnaqqis għandu jkun ekwivalenti għal tliet darbiet jew aktar.

- Ir-riżultati tal-kontroll b’E2: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b’E2 għandhom ikunu fi ħdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b’E2.

▼M8

- Riżultati tal-kontroll bid-DMSO: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO għandhom ikunu fi ħdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b'solvent.

- Esperiment li jonqos milli jilħaq xi wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni jiġi injorat u ripetut.

Test Komprensiv

Dan jinkludi l-kriterji ta' aċċettazzjoni mit-test tas-sejba tal-medda tal-antagonisti u dawn li ġejjin:

- Ir-riżultati tal-istandards referenzjarji: Il-kurva konċentrazzjoni rispons tal-istandard referenzjarju Ral/E2 għandha tkun ta' forma sigmojde u jkollha tal-anqas tliet valuri fi ħdan it-taqsima lineari tal-kurva konċentrazzjoni rispons.

- Riżultati tal-kontroll pożittiv: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'tamossifen/E2 għandhom ikunu anqas mill-medja tal-kontroll b'E2 nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard mill-medja tal-kontroll b'E2.

- Esperiment li jonqos milli jilħaq xi wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni jiġi injorat u ripetut.

Standards ta' Referenza, Pożittivi, u Kontrolli b'Veikolu

Kontroll b'Veikolu (Assaġġi Agonisti u Antagonisti)

12. Il-veikolu li jintuża biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'veikolu. Il-veikolu użat matul il-validazzjoni tal-assaġġ TA tal-ER VM7Luc kien ta' 1 % (v/v) dimetilsulfossidu (DMSO, CASRN 67-68-5) (ara l-paragrafu 24). Jekk jintuża veikolu ieħor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu, jekk dan ikun xieraq.

Standard ta' Referenza (Sejbien tal-Medda tal-Agonisti)

13. L-istandard referenzjarju hu E2 (CASRN 50-28-2). Għall-ittestjar tas-sejbien tal-medda, l-istandard ta' refernza hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' erba' konċentrazzjonijiet ta' E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ u $2,87 \times 10^{-12}$ M), b'kull konċentrazzjoni ttestjata fi bwejriet duplikati.

Standard Referenzjarju (Inklużi l-Agonisti)

14. E2 għall-ittestjar komprensiv hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' 1:2 li tikkonsisti fi 11-il konċentrazzjoni (li jvarjaw minn $3,67 \times 10^{-10}$ sa $3,59 \times 10^{-13}$ M) tal-E2 fi bwejriet duplikati.

Standard ta' Referenza (Sejbien tal-Medda tal-Antagonisti)

15. L-istandard referenzjarju hu taħlita tal-Ral (CASRN 84 449-90-1) u tal-E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 rgħall-ittestjar tas-sejbien tal-medda hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' tliet konċentrazzjonijiet ta' Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$, u $1,92 \times 10^{-10}$M) flimkien ma' konċentrazzjoni fissa ($9,18 \times 10^{-11}$ M) ta' E2 fi bwejriet duplikati.

Standard Referenzjarju (Inklużi l-Antagonisti)

16. Ral/E2 għall-ittestjar komprensiv hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' 1:2 ta' Ral (li tvarja minn $2,45 \times 10^{-8}$ sa $9,57 \times 10^{-11}$M) flimkien ma' konċentrazzjoni fissa ($9,18 \times 10^{-11}$ M) ta' E2 li tikkonsisti f'disa' konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 fi bwejriet duplikati.

Kontroll Pożittiv Dgħajjef (Agonist)

17. Il-kontroll pożittiv dgħajjef hu $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metossiklor (metossiklor; CASRN 72-43-5) fl-EFM.

▼M8

Kontroll Pożittiv Dgħajjef (Antagonist)

18. Il-kontroll pożittiv dgħajjef jikkonsisti f'tamossifen (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M b'9,18 × 10^{-11} M E2 fl-EFM.

Kontroll tal-E2 (Assaġġ tal-Antagonisti Biss)

19. Il-kontroll tal-E2 hu 9,18 × 10^{-11} M E2 fl-EFM u jintuża bħala kontroll negattiv tal-linja bażi.

Induzzjoni tad-Drabi (Agonist)

20. L-induzzjoni tal-attività ta' luċiferaži tal-istandard referenzjarju (E2) titkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-RLU tal-istandard referenzjarju b'E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO, u r-riżultat għandu jkun akbar minn erba' darbiet.

Tnaqqis tad-Drabi (Antagonist)

21. L-attività medja ta' luċiferaži tal-istandard referenzjarju (Ral/E2) titkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-RLU tal-istandard referenzjarju b'Ral/E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO, u għandu jkun akbar minn tliet darbiet.

Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f'"KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" ta' dan il-metodu ta' ttestjar)

Veikolu

22. Is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti f'solvent li jissolubilizza s-sustanza kimika tat-test u li jitħallat mal-medium taċ-ċelloli. L-ilma, l-etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) u d-DMSO huma veikoli xierqa. Jekk jintuża d-DMSO, il-livell ma għandux jaqbeż il-1 % (v/v). Għal kwalunkwe veikolu, għandu jintwera li l-volum massimu użat mhuwiex ċitotossiku u ma jinterferixxix mat-twettiq tal-assaġġ. L-istandards referenzjarji u l-kontrolli jiġu dissolti f'solvent 100 % u mbagħad jiġi dilwiti f'konċentrazzjonijiet xierqa fl-EFM.

Preparazzjoni tas-Sustanzi kimiċi tat-test

23. Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti fid-DMSO 100 % (jew solvent xieraq), u mbagħad jiġu dilwiti f'konċentrazzjonijiet xierqa fl-EFM. Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jitħallew jekwilibraw f'temperatura ambjentali qabel ma jiġu dissolti u dilwiti. Is-soluzzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jitħejjew friski għal kull esperiment. Is-soluzzjonijiet ma għandux ikollhom preċipitat jew dardir notevoli. L-istokks ta' standards referenzjarji u ta' kontroll jistgħu jitħejjew bl-ingrossa; madankollu, l-istandard referenzjarju, id-dilwizzjonijiet ta' kontroll u s-sustanzi kimiċi tat-test finali għandhom jitħejjew friski għal kull esperiment u jintużaw fi żmien 24 siegħa mit-tħejjija.

Solubbiltà u Ċitotossiċità: Kunsiderazzjonijiet għas-Sejbien tal-Medda

24. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'dilwizzjonijiet serjali ta' 1:10 b'seba' punti mwettqa f'duplikati. Għall-ewwel, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati sal-konċentrazzjoni massima ta' 1 mg/ml (~1 mM) għall-ittestjar tal-agonisti u ta' 20 μg/ml (~10 μM) għall-ittestjar tal-antagonisti. Jintużaw esperimenti ta' sejbien tal-medda biex jiġu determinati dawn li ġejjin:

— Il-konċentrazzjonijiet tal-bidu tas-sustanza kimika tat-test li għandhom jintużaw matul l-ittestjar komprensiv

— Id-dilwizzjonijiet (1:2 jew 1:5) tas-sustanza kimika tat-test li għandhom jintużaw matul l-ittestjar komprensiv

▼M8

25. Valutazzjoni tal-vijabbiltà/taċ-ċitotossiċità taċ-ċelloli hi inkluża fil-protokolli tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (7) u hi inkorporata fl-ittestjar għas-sejbien tal-medda u komprensiv. Il-metodu taċ-ċitotossiċità li ntuża biex tiġi vvalutata l-vijabbiltà taċ-ċelloli matul il-validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (1) kien metodu ta' osservazzjoni viżwali kwalitattiva skalat; madankollu, jista' jintuża metodu kwantitattiv għad-determinazzjoni taċ-ċitotossiċità (ara l-protokoll (7)). Ma tistax tintuża *data* minn konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test li jikkawżaw tnaqqis akbar minn 20 % fil-vijabbiltà.

Esponiment għas-Sustanza Kimika tat-Test u Organizzazzjoni tal-Pjastra tal-Assaġġ

26. Iċ-ċelloli jingħaddu u jitqiegħdu fi pjastri tal-koltura tat-tessuti b'96 bwejra (2×10^5 ċelloli għal kull bwejra) f'EFM u jiġu inkubati għal 24 siegħa biex iċ-ċelloli jitħallew jaqbdu mal-pjastra. L-EFM jitneħħa u jiġi sostiwit bis-sustanzi kimiċi tat-test u ta' referenza fl-EFM u jiġi inkubat għal 19-24 siegħa. Se jkollhom jiġu applikati kunsiderazzjonijiet speċjali għal dawk is-sustanzi li jkunu volatili ħafna peress li l-bwejriet tal-kontroll fil-viċin jistgħu jiġġeneraw riżultati pożittivi foloz. F'każjiet bħal dawn, "siġillanti tal-pjastri" jistgħu jgħinu biex effettivament jiżolaw il-bwejriet individwali matul l-ittestjar, u għalhekk huma rakkomandati.

Testijiet ta' Sejbien tal-Medda

27. L-ittestjar tas-sejbien tal-medda juża l-bwejriet kollha tal-pjastra b'96 bwejra biex jittestja sa sitt sustanzi kimiċi tat-test bħala dilwizzjonijiet serjali 1:10 b'seba' punti f'duplikat (ara l-Figuri 1 u 2).

— L-ittestjar tas-sejbien tal-medda *tal-agonisti* juża erba' konċentrazzjonijiet ta' E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju u erba' bwejriet replikati għall-kontroll bid-DMSO.

— L-ittestjar tas-sejbien tal-medda *tal-antagonisti* juża tliet konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 b'$9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju bi tliet bwejriet replikati għall-kontrolli b'E2 u bid-DMSO.

Figura 1

Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra għat-Test tas-Sejbien tal-Medda tal-Agonisti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abbrevjazzjonijiet: E2-1 sa E2-4 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'E2 (minn għoljin sa baxxi); TC1-1 sa TC1-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); TC3-1 sa TC3-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 3 (TC3); TC4-1 sa TC4-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 4 (TC4); TC5-1 sa TC5-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 5 (TC5); TC6-1 sa TC6-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 6 (TC6); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).

▼M8

Figura 2

Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra għat-Test tas-Sejbien tal-Medda tal-Antagonisti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abbrevjazzjonijiet: E2 = kontroll b'E2; Ral-1 sa Ral-3 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'Raloksifen/E2 (minn għoljin sa baxxi); TC1-1 sa TC1-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); TC3-1 sa TC3-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 3 (TC3); TC4-1 sa TC4-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 4 (TC4); TC5-1 sa TC5-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 5 (TC5); TC6-1 sa TC6-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 6 (TC6); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha jiġu ttestjati fil-preżenza ta' 9,18 × 10-11 M E2.

28. Il-volum finali rakkomandat tal-media meħtieġ għall kull bwejra hu ta' 200 µl. Uża biss pjastri tat-test li fihom iċ-ċelloli fil-bwejriet kollha jagħtu vijabbiltà ta' 80 % u aktar.

29. Id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-ittestjar komprensiv tal-***agonisti*** hi deskritta fid-dettall fil-protokoll tal-agonisti (7). Fil-qosor, jintużaw il-kriterji li ġejjin:

— Jekk ma jkun hemm ebda punt fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkun akbar mill-medja flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll bid-DMSO, l-ittestjar komprensiv isir bl-użu ta' dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt li tibda bil-konċentrazzjoni solubbli massima.

— Jekk ikun hemm punti fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkunu akbar mill-medja flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll bid-DMSO, il-konċentrazzjoni tal-bidu li tkun se tintuża għall-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt f'ittestjar komprensiv għandha tkun log ogħla mill-konċentrazzjoni li tagħti l-ogħla valur aġġustat tal-RLU fis-sejbien tal-medda. L-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt se tkun ibbażata fuq dilwizzjonijiet 1:2 jew 1:5 skont il-kriterji li ġejjin:

Għandha tintuża dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt jekk il-medda ta' konċentrazzjoni li tirriżulta tkopri l-medda sħiħa ta' risponsi fuq il-bażi tal-kurva ta' rispons tal-konċentrazzjoni ġenerata fit-test tas-sejbien tal-medda. Inkella, uża dilwizzjoni ta' 1:5.

▼**M8**

— Jekk sustanza kimika tat-test turi kurva konċentrazzjoni rispons bifażika fit-test tas-sejbien tal-medda, iż-żewġ fażijiet għandhom ikunu solvuti fl-ittestjar komprensiv ukoll.

30. Id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-ittestjar komprensiv tal-***antagonisti*** hi deskritta fid-dettall fil-protokoll tal-antagonisti (7). Fil-qosor, jintużaw il-kriterji li ġejjin:

— Jekk ma jkun hemm ebda punt fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkun anqas mill-medja nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll b'E2, l-ittestjar komprensiv isir bl-użu ta' dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt li tibda bil-konċentrazzjoni solubbli massima.

— Jekk ikun hemm punti fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkunu anqas mill-medja nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll b'E2, il-konċentrazzjoni tal-bidu li tkun se tintuża għall-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt f'ittestjar komprensiv għandha tkun waħda minn dawn li ġejjin:

• Il-konċentrazzjoni li tagħti l-anqas valur aġġustat tal-RLU fis-sejbien tal-medda

• Il-konċentrazzjoni solubbli massima (Ara l-protokoll tal-antagonisti (7), Figura 14-2)

• L-anqas konċentrazzjoni ċitotossika (Ara l-protokoll tal-antagonisti (7), Figura 14-3 għal eżempju relatat)

— L-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt se tkun ibbażata fuq serjali jew dilwizzjoni ta' 1:2 jew 1:5 skont il-kriterji li ġejjin:

Għandha tintuża dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt jekk il-medda ta' konċentrazzjoni li tirriżulta tkopri l-medda sħiħa ta' risponsi fuq il-bażi tal-kurva ta' rispons tal-konċentrazzjoni ġenerata fit-test tas-sejbien tal-medda. Inkella għandha tintuża dilwizzjoni ta' 1:5.

Testijiet Komprensivi

31. L-ittestjar komprensiv jikkonsisti f'dilwizzjonijiet serjali bi 11-il punt (dilwizzjonijiet serjali ta' 1:2 jew 1:5 fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni tal-bidu għall-kriterji ta' ttestjar komprensiv) b'kull konċentrazzjoni ttestjata fi bwejriet triplikati tal-pjastra b'96 bwejra (ara l-Figuri 3 u 4).

— L-ittestjar komprensiv tal-*agonisti* juża 11-il konċentrazzjoni ta' E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju. Erba' bwejriet replikati għal-kontroll bid-DMSO u erba' bwejriet repliki għall-kontroll b'metossiklor ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M) jiġu inklużi f'kull pjastra.

— L-ittestjar komprensiv tal-*antagonisti* juża disa' konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 b'$9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju, b'erba' bwejriet repliki għall-kontroll b'E2 $9{,}18 \times 10^{-11}$ M, erba' bwejriet repliki għall-kontrolli bid-DMSO, u erba' bwejriet repliki għat-tamossifen $3{,}36 \times 10^{-6}$M.

▼M8

Figura 3

Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra għat-Test Komprensiv tal-Agonisti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Abbrevjazzjonijiet: TC1-1 sa TC1-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1; TC2-1 sa TC2-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2; E2-1 sa E2-11 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'E2 (minn għoljin sa baxxi); Met = kontroll pożittiv dgħajjef b'p,p' metossiklor; VC = kontroll b'veikolu tal-EFM bid-DMSO (1 % v/v)

Figura 4

Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra għat-Test Komprensiv tal-Antagonisti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abbrevjazzjonijiet: E2 = kontroll b'E2; Ral-1 sa Ral-9 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'Raloksifen/E2 (minn għoljin sa baxxi); Tam = kontroll pożittiv dgħajjef b'Tamossifen/E2; TC1-1 sa TC1-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).Nota: Kif innotat, kull bwejra ta' referenza u tat-test ikun fiha konċentrazzjoni fissa ta' E2 (9,18 x 10-11M)

32. Testijiet komprensivi ripetuti għall-istess sustanza kimika għandhom jitwettqu f'jiem differenti, biex tiġi żgurata indipendenza. Tal-anqas għandhom isiru żewġ testijiet komprensivi. Jekk ir-riżultati tat-testijiet jikkontradixxu lil xulxin (eż. test minnhom ikun pożittiv, u l-ieħor negattiv), jew jekk wieħed mit-testijiet ikun inadegwat, għandu jsir it-tielet test addizzjonali.

Kejl tal-Luminexxenza

33. Il-luminexxenza titkejjel fil-medda ta' 300 sa 650 nm, bl-użu ta' luminometru tal-injezzjoni u b'softwer li jikkontrolla l-volum tal-injezzjoni u l-intervall tal-kejl (7). L-emissjoni tad-dawl minn kull bwejra hi espressa bħala RLU għal kull bwejra.

▼M8

ANALIŻI TAD-*DATA*

Determinazzjoni tal-EC_{50} /IC_{50}

34. Il-valur tal-EC_{50} (il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test [agonisti]) u l-valur tal-IC_{50} (il-konċentrazzjoni inibitorja medjana ta' sustanza kimika tat-test [antagonisti]) huma determinati mid-*data* dwar ir-rispons għall-konċentrazzjoni. Għal sustanzi kimiċi tat-test li huma pożittivi f'waħda mill-konċentrazzjonijiet jew aktar, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża rispons medjana (IC_{50} jew EC_{50}) hi kkalkolata bl-użu ta' analiżi tal-funzjoni Hill jew ta' alternattiva xierqa. Il-funzjoni Hill hi mudell matematiku loġistiku b'erba' parametri relatat mal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mar-rispons (tipikament skont kurva sigmojde) bl-użu tal-ekwazzjoni ta' hawn taħt:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

Fejn:

Y = rispons (jiġifieri RLUs);

X = il-logaritmu tal-konċentrazzjoni;

Il-qiegħ = ir-rispons minimu;

Il-quċċata = ir-rispons massimu;

lg EC_{50} (jew lg IC_{50}) = il-logaritmu ta' X bħala n-nofs tar-rispons bejn il-Quċċata u l-Qiegħ;

Hillslope = il-gradjent tal-kurva.

Il-mudell jikkalkola liema huma l-aktar xierqa għall-parametri tal-Quċċata, tal-Qiegħ, tal-Hillslope, u tal-IC_{50} u tal-EC_{50}. Għall-kalkolu tal-valuri tal-EC_{50} u tal-IC_{50}, għandu jintuża softwer statistiku xieraq (eż. softwer statistiku Graphpad Prism®).

Determinazzjoni tal-Eċċezzjonijiet Estremi

35. Ġudizzju statistiku tajjeb jista' jiġi ffaċilitat billi jiġi inkluż it-test-Q (iżda mhux limitat għalih biss) (ara l-protokolli tal-agonisti u tal-antagonisti (7) għad-determinazzjoni ta' bwejriet "mhux utilizzabbli" li se jiġu eskluži mill-analiżi tad-*data*.

36. Għal repliki tal-istandard referenzjarju b'E2 (daqs ta' tnejn tal-kampjun), kwalunkwe valur aġġustat tal-RLU għal replika f'konċentrazzjoni partikolari ta' E2 jitqies eċċezzjoni estrema jekk il-valur tiegħu jkun aktar minn 20 % aktar jew anqas mill-valur tal-RLU aġġustat għal dik il-konċentrazzjoni fil-bażi ta' *data* storika.

Il-Ġbir u l-Aġġustament tad-*Data* tal-Luminometru għall-Ittestjar tas-Sejbien tal-Medda

37. Id-*data* mhux proċessata mil-luminometru għandha tiġi trasferita fi spreadsheet mudell imfassla għall-assaġġ. Għandu jiġi determinat jekk hemmx punti ta' *data* li jkunu eċċezzjonijiet estremi li jridu jitneħħew. (Ara l-Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test għal parametri li huma determinati fl-analiżijiet). Għandhom isiru l-kalkoli li ġejjin:

Agonist

Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-kontroll b'veikolu (VC) DMSO.

Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

▼M8

Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (E2).

Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-EC_{50} għas-sustanzi kimiċi tat-test.

Antagonist

Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.

Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3 Ikkalkola t-tnaqqis medju tad-drabi għall-istandard referenzjarju (Ral/E2).

Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju għall-istandard referenzjarju b'E2.

Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju tal-IC50 għas-sustanzi kimiċi tat-test.

Il-Ġbir u l-Aġġustament tad-*Data* tal-Luminometru għall-Ittestjar Komprensiv

38. *Data* mhux proċessata mil-luminometru għandha tiġi trasferita fi spreadsheet mudell imfassla għall-assaġġ. Għandu jiġi determinat jekk hemmx punti ta' *data* li jkunu eċċezzjonijiet estremi li jridu jitneħħew. (Ara l-Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test għal parametri li huma determinati fl-analiżijiet). Isiru l-kalkoli li ġejjin:

Agonist

Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.

Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (E2).

Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-EC_{50} għall-E2 u għas-sustanzi kimiċi tat-test.

Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju aġġustat tal-RLU għall-metossiklor.

Antagonist

Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.

Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (Ral/E2).

Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-IC_{50} għall-Ral/E2 u għas-sustanzi kimiċi tat-test.

Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju aġġustat tal-RLU għat-tamossifen.

Stadju 6 Ikkalkola l-valur medju għall-istandard referenzjarju b'E2.

▼M8

Il-Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

39. It-TA tal-ER VM7Luc hu maħsub bħala parti minn approċċ tal-piż tal-evidenza biex jgħin fil-prijoritizzazzjoni tas-sustanzi għall-ittestjar tal-ED *in vivo*. Parti minn din il-proċedura ta' prijoritizzazzjoni se tkun il-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala pożittiva jew negattiva għall-attività agonista jew antagonista tal-ER. Il-kriterji ta' deċiżjoni pożittiva u negattiva użati fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc huma deskritti fit-Tabella 1.

Tabella 1

Kriterji ta' Deċiżjoni Pożittiva u Negattiva

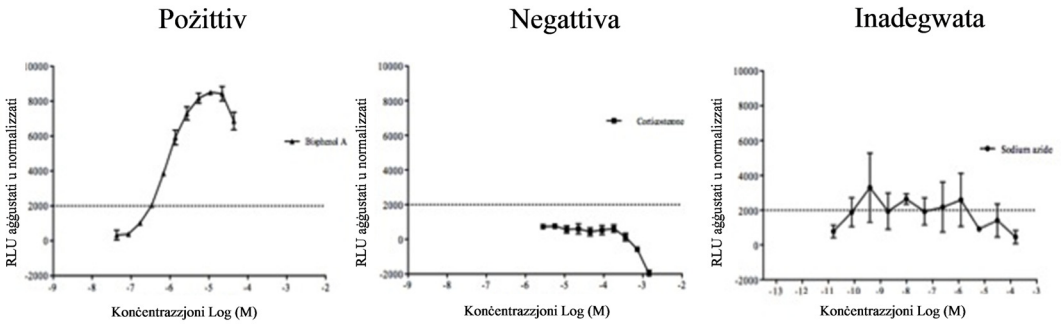
ATTIVITÀ AGONISTA	
Pożittiva	— Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha klassifikati bħala *pożittivi għal* attività agonista tal-ER għandu jkollhom kurva konċentrazzjoni-rispons li tikkonsisti f'linja baži, segwita minn pendil pożittiv, u li tikkonkludi fi plateau jew f'quċċata. F'xi każijiet, tnejn biss minn dawn il-karatteristiċi (linja baži–pendil jew pendil–quċċata) ikunu jistgħu jiġu definiti. — Il-linja li tiddefinixxi l-pendil pożittiv għandu jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba (medja ± SD). Il-punti li jifformaw il-linja baži huma esklużi, iżda l-parti lineari tal-kurva tista' tinkludi l-quċċata jew l-ewwel punt tal-plateau. — Klassifikazzjoni pożittiva teħtieġ amplitudni tar-rispons, id-differenza bejn il-linja baži u l-quċċata, ta' tal-anqas 20 % tal-valur massimali għall-istandard referenzjarju, E2 (jiġifieri 2000 RLU jew aktar meta l-valur tar-rispons massimali tal-istandards referenzjarji [E2] ikun aġġustat għal 10,000 RLU). — Jekk possibbli, valur tal-EC_{50} għandu jiġi kkalkolat għal kull sustanza kimika tat-test pożittiva.
Negattiv	L-RLU aġġustata medja għal konċentrazzjoni partikolari tkun fil-livell tal-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-RLU bid-DMSO jew aktar.
Inadegwata	*Data* li ma tistax tiġi interpretata bħala valida għall-wiri tal-preżenza jew tal-assenza tal-attività minħabba limitazzjonijiet kwalitattivi jew kwantitattivi kbar titqies inadegwata u ma tistax tintuża biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix pożittiva jew negattiva. Is-sustanzi kimiċi għandhom jerġgħu jiġu ttestjati.
ATTIVITÀ ANTAGONISTA	
Pożittiva	— Id-*data* dwar is-sustanza kimika tat-test tipproduċi kurva konċentrazzjoni rispons li tikkonsisti f'linja baži, li tkun segwita minn pendil negattiv. — Il-linja li tiddefinixxi l-pendil negattiv għandu jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba; punti li jifformaw il-linja baži huma esklużi, iżda l-parti lineari tal-kurva tista' tinkludi l-ewwel punt tal-plateau. — Għandu jkun hemm tnaqqis ta' tal-anqas 20 % fl-attività mill-valur massimali għall-istandard referenzjarju, Ral/E2 (jiġifieri 8 000 RLU jew anqas meta l-valur tar-rispons massimali tal-istandard referenzjarju [Ral/E2] ikun aġġustat għal 10,000 RLU). — L-ogħla konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi tas-sustanza kimika tat-test għandhom ikunu ekwivalenti għal $1x10^{-5}$ M jew anqas. — Jekk possibbli, valur tal-IC_{50} għandu jiġi kkalkolat għal kull sustanza kimika tat-test pożittiva.
Negattiva	Il-punti tad-*data* kollha huma ogħla mill-valur tal-EC_{80} (80 % tar-rispons tal-E2, jew 8 000 RLUs), f'konċentrazzjonijiet anqas minn $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Inadegwata	Id-*data* li ma tistax tiġi interpretata bħala valida għall-wiri tal-preżenza jew tal-assenza tal-attività minħabba limitazzjonijiet kwalitattivi jew kwantitattivi kbar titqies inadegwata u ma tistax tintuża biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix pożittiva jew negattiva. Is-sustanza kimika għandha terġa' tiġi ttestjata.

▼**M8**

40. Ir-riżultati pożittivi jiġu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett kif ukoll mill-konċentrazzjoni li fiha jseħħ l-effett, fejn possibbli. L-eżempji ta' *data* pożittiva, negattiva u inadegwata huma murija fil-Figuri 5 u 6.

Figura 5

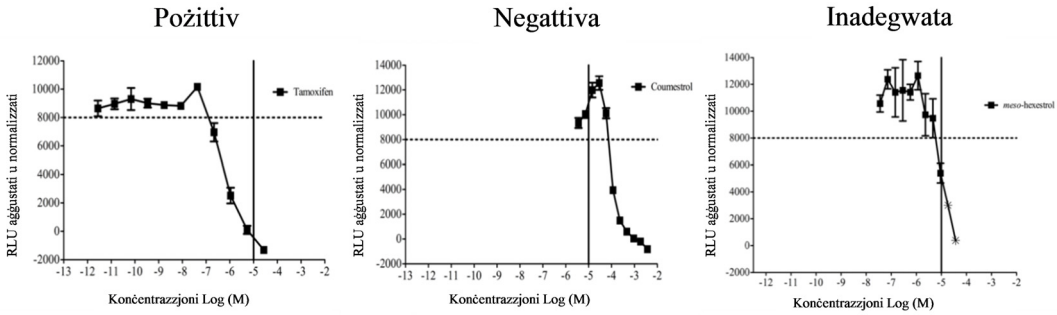
Eżempji ta' Agonisti: *Data* Pożittiva, Negattiva u Inadegwata



Linja ttikkjata tindika 20 % tar-rispons tal-E2, 2000 RLU aġġustati u normalizzati.

Figura 6

Eżempji ta' Antagonisti: *Data* Pożittiva, Negattiva u Inadegwata



Linja ttikkjata tindika 80 % tar-rispons tal-Ral/E2, 8 000 RLU aġġustati u normalizzati.

Linja solida tinidka 1,00 x 10-5 M. Biex rispons jitqies pożittiva, għandu jkun anqas mil-linja tat-8 000 RLU, u f'konċentrazzjonijiet ta' anqas minn 1,00 x 10-5M.

Il-konċentrazzjonijiet b'asterisk fil-graff mesoeżestrol jindikaw punteġġi ta' vijabbiltà ta' "2" jew aktar.

Ir-riżultati tat-test għall-mesoeżestrol huma meqjusa *data* inadegwata għaliex l-uniku rispons li hu anqas minn 8,000 RLU iseħħ f'1,00 x 10-5M.

41. Il-kalkoli tal-EC_{50} u tal-IC_{50} jistgħu jsiru bl-użu ta' Funzjoni Hill b'erba' parametri (ara l-protokoll tal-agonisti u l-protokoll tal-antagonisti għal aktar dettalji (7)). L-ilħuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà jindika li s-sistema qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni partikolari tipproduċi *data* preċiża. Id-duplikazzjoni tar-riżultati tal-ewwel sessjoni hi l-aħjar garanzija li tkun ġiet prodotta *data* preċiża (ara l-paragrafu 19 tal-"KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER").

▼**M8**

RAPPORT TAT-TEST

42. Ara l-paragrafu 20 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER".

DOKUMENTAZZJONI

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. u Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Appendiċi 4

ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RIĊETTUR-A TAL-ESTROĠENU UMAN TRANSFETTAT B'MOD STABBLI GĦAD-DETEZZJONI TA' ATTIVITÀ AGONISTA U ANTAGONISTA TA' SUSTANZI KIMIĊI BL-UŻU TAL-LINJA TA' ĊELLOLI ERA CALUX

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. L-assaġġ tat-transattivazzjoni tal-ERα CALUX juża l-linja ta' ċelloli umana U2Os biex jindividwa attività agonista u antagonista estroġenika medjata permezz tar-riċettur alfa tal-estroġenu uman (hERα). L-istudju ta' validazzjoni tal-bijoassaġġ ERα CALUX transfettat b'mod stabbli minn BioDetection Systems BV (Amsterdam, in-Netherlands) wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ għall-iskop maħsub tiegħu (1). Il-linja ta' ċelloli ERα CALUX tesprimi ERα uman transfettat b'mod stabbli biss (2)(3).

2. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa transattivazzjoni medjata minn hERα billi jkejjel il-bijoluminexxenza bħala l-punt ta' tmiem. L-użu tal-bijoluminexxenza jintuża spiss fil-bijoassaġġi minħabba l-proporzjon għoli ta' sinjal għal storbju (4).

3. Konċentrazzjonijiet ta' fitoestrġenu ogħla minn 1 μM ġew rapportati li jattivaw b'mod eċċessiv il-ġene indikatur tal-luċiferaży, li jirriżulta f'luminexxenza medjata mhux minn riċettur (5) (6) (7). Għaldaqstant, konċentrazzjonijiet ogħla ta' fitoestroġeni jew ta' komposti simili oħra li jistgħu jattivaw b'mod eċċessiv l-espressjoni ta' luċiferaży, iridu jiġu eżaminati bir-reqqa f'assaġġi ta' transattivazzjoni tal-ER transfettati b'mod stabbli (ara l-Appendiċi 2).

4. Għandhom jinqraw "INTRODUZZJONI ĠENERALI" u "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. Il-bijoassaġġ jintuża biex jivvaluta l-irbit tal-ligand tal-ER u t-traslokazzjoni sussegwenti tal-kumpless riċettur-ligand għan-nukleu. Fin-nukleu, il-kumpless riċettur-ligand jillega elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva ġene indikatur tal-luċiferaży tal-firefly, li jirriżulta f'espressjoni ċellolari miżjuda tal-enzima luċiferaży. Wara ż-żieda tas-substrat tal-luċiferaży, il-luċiferina, il-luċiferina tiġi trasformata fi prodott bijoluminexxenti. Id-dawl prodott faċilment jista' jiġi individwat u kwantifikat bl-użu ta' luminometru.

6. Is-sistema tat-test tuża ċelloli CALUX ERα transfettati b'mod stabbli. Iċ-ċelloli CALUX ERα oriġinaw mil-linja ta' ċelloli osteosarkoma osteoblastika umana U2OS. Iċ-ċelloli U2OS umani ġew transfettati b'mod stabbli bi 3xHRE-TATA-Luc u b'pSG5-neo-hERα bl-użu ta' metodu ta' kopreċipitazzjoni tal-fosfat tal-kalċju. Il-linja ta' ċelloli tal-U2OS intgħażlet bħala l-aħjar kandidat biex isservi bħala l-linja ta' ċelloli indikatur risponsiva tal-estroġenu (u ta' ormon ieħor ta' sterojde), fuq il-bażi tal-osservazzjoni li l-linja ta' ċelloli U2OS ftit li xejn uriet attività ta' riċettur endoġenu jew l-ebda attività affattu. L-assenza ta' riċetturi endoġeni ġiet ivvalutata bl-użu ta' plażmidi indikaturi tal-luċiferaży biss, li ma wrew ebda attività meta żdiedu l-ligandi tar-riċettur. Barra minn hekk, din il-linja ta' ċelloli sostniet risponsi b'saħħithom medjati bl-ormoni meta ġew introdotti b'mod tranżjenti r-riċetturi konjati (2) (3) (8).

7. L-ittestjar ta' sustanzi kimiċi għal attività estroġenika jew antiestroġenika bl-użu tal-linja ta' ċelloli CALUX ERα jinkludi sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u sessjonijiet komprensivi. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, jiġu determinati s-solubbiltà, iċ-ċitotossiċità u medda ta' konċentrazzjoni rfinuta ta'

▼M8

sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv. Matul is-sessjonijiet komprensivi, il-meded ta' konċentrazzjoni rfinuti tas-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati fil-bijoassaġġi ERα CALUX segwiti mill-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-agoniżmu jew għall-antagoniżmu.

8. Il-kriterji għall-interpretazzjoni tad-*data* huma deskritti fid-dettall fil-paragrafu 59. Fil-qosor, sustanza kimika tat-test titqies pożittiva għall-agoniżmu f'każ li tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test juru rispons li jkun ekwivalenti għal 10 % jew ogħla minn 10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju 17β-estradjol (PC_{10}). Sustanza kimika tat-test titqies pożittiva għall-antagoniżmu f'każ li tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test juru rispons li jkun ekwivalenti għal 80 % jew anqas minn 10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju tamossifen (PC_{80}).

PROĊEDURA

Linji ta' ċelloli

9. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli U2OS ERα CALUX għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli tista' tinkiseb mingħand BioDetection Systems BV, Amsterdam, in-Netherlands bi ftehim ta' liċenzjar tekniku.

10. Għandhom jintużaw kolturi ta' ċelloli ħielsa minn mikoplażma biss. Il-lottijiet taċ-ċelloli użati għandhom ikunu ċċertifikati negattivi għall-kontaminazzjoni bil-mikoplażma, jew inkella għandu jsir test tal-mikoplażma qabel l-użu. Għandu jintuża RT-PCR (Reazzjoni Katina bil-Polimeraži f'Ħin Reali) għad-detezzjoni sensittiva ta' infezzjoni tal-mikoplażma (9).

Stabbiltà tal-linja ta' ċelloli

11. Biex jinżammu l-istabbiltà u l-integrità taċ-ċelloli CALUX, iċ-ċelloli għandhom jinħażnu f'nitroġenu likwidu (-80 ^{0}C). Wara li ċ-ċelloli jitħallew jinħallu biex tinbeda koltura ġdida, iċ-ċelloli għandhom jiġu subkolturati tal-anqas darbtejn qabel ma jintużaw għall-valutazzjoni tal-attività agonista u antagonista estroġenika tas-sustanzi kimiċi. Iċ-ċelloli ma għandhomx jiġu subkolturati għal aktar minn 30 passaġġ.

12. Biex tiġi ssorveljata l-istabbiltà tal-linja ta' ċelloli maż-żmien, ir-risponsività tas-sistema tat-test agonistika u antagonistika għandha tiġi verifikata bl-evalwazzjoni tal-EC_{50} jew tal-IC_{50} tal-istandard referenzjarju. Barra minn hekk, l-induzzjoni relattiva tal-kampjun tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kampjun tal-kontroll negattiv (NC) għandha tiġi ssorveljata. Ir-riżultati għandhom ikunu jaqblu mal-kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaġġ ERα CALUX agonistiku (Tabella 3C) jew antagonistiku (Tabella 4C). L-istandards referenzjarji, il-kontrolli pożittivi u dawk negattivi huma mogħtija fit-Tabella 1 u fit-Tabella 2 għall-modalità agonistika u dik antagonistika rispettivament.

Koltura taċ-Ċelloli u kundizzjonijiet tal-pjastrament

13. Iċ-ċelloli U2OS għandhom jiġu kolturati f'medium tat-tkabbir (DMEM/F12 (1:1) b'fenol aħmar bħala indikatur tal-pH, suppimentat b'serum bovin fetali (7,5 %), amminoaċidi mhux essenzjali (1 %), 10 Unitajiet/ml peniċillina, sterptomiċina u ġeneticina (G-418) bħala markatur tal-għażla). Iċ-ċelloli għandhom jitqiegħdu f'inkubatur tas-CO_2 (5 % CO_2) f'37 ^{0}C u f'100 % umdità. Meta ċ-ċelloli jilħqu konfluwenza ta' 85-95 %, iċ-ċelloli għandhom jiġu subkolturati jew jitħejjew għaż-żriegħ fi pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra. Fil-każ imsemmi l-aħħar, iċ-ċelloli għandhom jerġgħu jiġu sospiżi f'1x10^5 ċelloli/ml f'medium tal-assaġġ ħieles minn estroġenu (medium DMEM/F12 (1:1) mingħajr fenol aħmar, supplimentat b'serum bovin fetali trattat bil-Faħam Miksi bid-Dekstran (5 % v/v), b'amminoaċidi mhux essenzjali (1 % v/v), b'10 Units/ml ta' peniċillinau streptomiċina) u jiġu pjastrati fil-bwejriet tal-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (sospensjoni ta' 100 µl ċelloli omoġenizzati). Iċ-ċelloli għandhom jiġu inkubati minn qabel f'inkubatur tas-CO_2 (5 % CO_2, 37 ^{0}C, 100 % umdità) għal 24 siegħa qabel l-esponiment. L-oġġetti tal-plastik għandhom ikunu ħielsa minn estroġenu.

▼M8

Kriterji ta' aċċettabbiltà

14. L-attivitajiet agonistiċi u antagonistiċi tas-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test jiġu ttestjati f'serje ta' testijiet. Serje ta' testijiet tikkonsisti f'massimu ta' sitt pjastri għall-mikrotitraġġ. Kull serje ta' testijiet fiha tal-anqas serje waħda sħiħa ta' dilwizzjonijiet ta' standard referenzjarju, kampjun tal-kontroll pożittiv, kampjun tal-kontroll negattiv u kontrolli b'solvent. Il-Figuri 1 u 2 jagħtu l-kompożizzjoni tal-pjastri għas-serje tat-testijiet agonistiċi u antagonistiċi.

15. Kull dilwizzjoni tal-istandards ta' referenza, tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-kontrolli b'solvent kollha, u tal-kontrolli pożittivi u negattivi għandha tiġi analizzata fi triplikat. Kull waħda mill-analiżijiet tat-triplikat għandha tissodisfa r-rekwiżiti mogħtija fit-Tabella 3A u fit-Tabella 4A.

16. Serje kompluta ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju (17β-estradjol għall-agoniżmu; tamossifen għall-antagoniżmu) titkejjel fl-ewwel pjastra f'kull serje ta' testijiet. Biex ikunu jistgħu jitqabblu r-riżultati tal-analiżi tal-ħames pjastri għall-mikrotitraġġ li jifdal bl-ewwel pjastra għall-mikrotitraġġ li fiha l-kurva konċentrazzjoni rispons sħiħa tal-istandard referenzjarju, il-pjastri kollha għandu jkun fihom tliet kampjuni tal-kontroll: kontroll b'solvent, l-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju ttestjat, u l-konċentrazzjoni approssimata tal-EC_{50} (agoniżmu) jew tal-IC_{50} (antagoniżmu) tal-istandard referenzjarju. Il-proporzjon tal-kampjuni tal-kontroll medji fl-ewwel pjastra u fil-ħames pjastri li jifdal għandu jissodisfa r-rekwiżiti kif mogħtija fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

17. Għal kull waħda mill-pjastri għall-mikrotitraġġ fi ħdan serje ta' testijiet, jiġi kkalkolat il-fattur-z (10). Il-fattur-z għandu jiġi kkalkolat bl-użu tar-risponsi fl-ogħla u fl-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Pjastra għall-mikrotitraġġ titqies valida f'każ li tkun tissodisfa r-rekwiżiti stipulati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

18. L-istandard referenzjarju għandu juri kurva doża-rispons sigmojde. L-EC_{50} jew l-IC_{50} miksub mir-rispons tas-serje ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju għandu jissodisfa r-rekwiżiti kif indikati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

19. Kull serje ta' testijiet għandu jkun fiha kampjun tal-kontroll pożittiv u kampjun tal-kontroll negattiv. L-induzzjoni relattiva kkalkolata tal-kampjun tal-kontroll kemm pożittiv kif ukoll dak negattiv għandha tissodisfa r-rekwiżiti kif indikati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

20. Matul il-kejlijiet kollha, il-fattur ta' induzzjoni tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju għandu jitkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla rispons medju tal-unità tad-dawl relattiva (RLU) tal-istandard referenzjarju 17β-estradjol bir-rispons medju tal-RLU tal-kontroll b'solvent ta' referenza. Dan il-fattur ta' induzzjoni għandu jissodisfa r-rekwiżiti minimi għall-induzzjoni tad-drabi kif indikat fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

21. Pjastri għall-mikrotitraġġ li jissodisfaw dawn il-kriterji ta' aċċettazzjoni msemmija hawn fuq kollha biss jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test.

22. Il-kriterji ta' aċċettazzjoni huma applikabbli kemm għas-sessjonijiet ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll għal dawk komprensivi.

▼M8

Tabella 1

Konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju, tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kontroll negattiv (NC) għall-bijoassaġġ agonistiku CALUX.

	Sustanza	CAS RN	Medda tat-test (M)
Standard ta' referenza	17β-estradjol	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Kontroll pożittiv (PC)	17α-metiltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Kontroll Negattiv (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabella 2

Konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju, tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kontroll negattiv (NC) għall-bijoassaġġ antagonistiku CALUX.

	Sustanza	CAS RN	Medda tat-test (M)
Standard ta' referenza	tamossifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Kontroll pożittiv (PC)	4-idrossitamossifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Kontroll Negattiv (NC)	resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabella 3

Kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaġġ agonistiku ERα CALUX

A - kampjuni individwali fuq pjastra		Kriterji
1	% SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal NC, PC, kull dilwizzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tal-istandard referenzjarju, ħlief C0)	< 15 %
2	% SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal standard referenzjarju u għal kontrolli b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (C0, SC))	< 30 %
3	Tnixxija massima ta' LDH, bħala kejl ta' ċitotossiċità	< 120 %
B - fi ħdan pjastra waħda għall-mikrotitraġġ		
4	Proporzjon tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju (C0; pjastra 1) u l-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (SC; pjastri 2 sa x)	0,5 sa 2,0
5	Proporzjon tal-appr. EC50 u l-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastra 1 u l-appr. EC50 u l-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastri 2 sa x (C4, C8)	0,70 sa 1,30
6	Fattur-Z għal kull pjastra	>0,6
C - fi ħdan sensiela waħda ta' analiżijiet (il-pjastri kollha fi ħdan sensiela waħda)		
7	Kurva sigmojde tal-istandard referenzjarju	Iva (17ß-estradjol)
8	standard referenzjarju tal-medda ta' EC50 ta' 17ß-estradjol	4*10-12 – 4*10-11 M
9	Induzzjoni minima tad-drabi tal-ogħla konċentrazzjoni ta' 17ß-estradjol, fir-rigward tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju.	5
10	Induzzjoni relattiva (%) PC	> 30 %
11	Induzzjoni relattiva (%) NC	<10 %

▼M8

Appr.: approssimattiv; PC: kontroll pożittiv; NC: kontroll negattiv; SC: kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test; C0: kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju; SD: devjazzjoni standard; LDH: lattatdeidroġenaži

Tabella 4

Kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaġġ antagonistiku ERα CALUX

A - kampjuni individwali fuq pjastra		**Kriterji**
1	% SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal NC, PC, kull dilwizzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tal-istandard referenzjarju, kontroll b'solvent (C0))	< 15 %
2	% SD massimu ta' bwejriet triplikati (għall-kontroll b'veikolu (VC) u l-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju (C8))	< 30 %
3	Tnixxija massima ta' LDH, bħala kejl ta' ċitotossiċità	< 120 %
B - fi ħdan pjastra waħda għall-mikrotitraġġ		
4	Proporzjon tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju (C0; pjastra 1) u l-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (SC; pjastri 2 sa x)	0,70 sa 1,30
5	Proporzjon tal-appr. konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju tal-IC50 fil-pjastra 1 u l-appr. konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju tal-IC50 fil-pjastri 2 sa x (C4, C8)	0,70 sa 1,30
6	Proporzjon tal-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastra 1 u l-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastri 2 sa x (C8)	0,50 sa 2,0
7	Fattur-Z għal kull pjastra	>0,6
C - fi ħdan sensiela waħda ta' analiżijiet (il-pjastri kollha fi ħdan sensiela waħda)		
8	Kurva sigmojde tal-istandard referenzjarju	Iva (Tamossifen)
9	standard referenzjarju tal-medda ta' IC50 (Tamossifen)	1*10-8 - 1*10-7 M
10	Induzzjoni minima t'a drabi tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju, fir-rigward tal-ogħla konċentrazzjoni ta' Tamossifen.	2,5
11	Induzzjoni relattiva (%) PC	<70 %
12	Induzzjoni relattiva (%) NC	>85 %

Appr.: approssimattiv; PC: kontroll pożittiv; NC: kontroll negattiv; VC: kontroll b'veikolu (kontroll b'solvent mingħajr konċentrazzjoni fissa ta' standard referenzjarju agonist); SC: kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test; C0: kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju; SD: devjazzjoni standard; LDH: lattatdeidroġenaži

Kontroll b'solvent/b'veikolu, standards referenzjarji, kontrolli pożittivi, kontrolli negattivi

23. Kemm għas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll għas-sessjonijiet komprensivi, għandhom jintużaw l-istess kontroll b'solvent/b'veikolu, standards ta' referenza, kontrolli pożittivi u kontrolli negattivi. Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni ta' standards referenzjarji, ta' kontrolli pożittivi u ta' kontrolli negattivi għandha tkun l-istess.

▼**M8**

Kontrolli tas-solvent

24. Is-solvent użat biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'solvent. Dimetilsulfossidu (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) intuża bħala veikolu matul il-validazzjoni tal-bijoassaġġ ERα CALUX. Jekk jintuża solvent ieħor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu. Jekk jogħġbok kun af li l-kontroll b'solvent għal studji antagonistiċi fih konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol (konċentrazzjoni approssimattiva tal-EC_{50}) Biex jiġi ttestjat is-solvent użat għall-istudji antagonistiċi, għandu jitħejja u jiġi ttestjat kontroll b'veikolu.

Kontroll b'veikolu (antagoniżmu)

25. Għall-ittestjar tal-antagoniżmu, il-medium tal-assaġġ hu supplimentat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol (konċentrazzjoni approssimattiva tal-EC_{50}). Biex jiġi ttestjat is-solvent użat għad-dissoluzzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-antagoniżmu, għandu jitħejja medium tal-assaġġ mingħajr konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol. Dan il-kampjun tal-kontroll hu indikat bħala l-kontroll b'veikolu. Dimetilsulfossidu (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) intuża bħala veikolu matul il-validazzjoni tal-bijoassaġġ ERα CALUX. Jekk jintuża solvent ieħor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu.

Standards ta' referenza

26. L-istandard referenzjarju agonistiku hu 17β-estradjol (Tabella 1). L-istandards referenzjarji jinkludu sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' tmien konċentrazzjonijiet ta' 17β-estradjol ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. L-istandard referenzjarju antagonistiku hu tamossifen (Tabella 2). L-istandards referenzjarji jinkludu sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' tmien konċentrazzjonijiet ta' tamossifen ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju antagonistiku tiġi koinkubata b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17β-estradjol ($3*10^{-12}$ M).

Kontroll pożittiv

28. Il-kontroll pożittiv għall-istudji agonistiċi hu 17α-metiltestosteron (Tabella 1).

29. Il-kontroll pożittiv għall-istudji antagonistiċi hu 4-idrossitamossifen (Tabella 2). Il-kontroll pożittiv antagonistiku jiġi koinkubat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17β-estradjol ($3*10^{-12}$ M).

Kontroll negattiv

30. Il-kontroll negattiv għall-istudji agonistiċi hu kortikosteron (Tabella 1).

31. Il-kontroll negattiv għall-istudji antagonistiċi hu resveratrol (Tabella 2). Il-kontroll negattiv antagonistiku jiġi koinkubat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17β-estradjol ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Wiri tal-profiċjenza tal-laboratorju (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" ta' dan il-metodu ta' ttestjar)

Veikolu

32. Is-solvent użat biex jiġu dissolti s-sustanzi kimiċi tat-test għandu jissolubilizza s-sustanza kimika tat-test għalkollox u għandu jkun jitħallat mal-medium taċ-ċellola. DMSO, ilma u etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) huma solventi xierqa. F'każ li jintuża DMSO bħala solvent, il-konċentrazzjoni massima ta' DMSO matul l-inkubazzjoni ma għandhiex taqbeż il-1 % (v/v). Qabel l-użu, is-solvent għandu jiġi ttestjat għall-assenza ta' ċitotossiċità u ta' interferenza mal-prestazzjoni tal-assaġġi.

Preparazzjoni tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test

33. L-istandards referenzjarji, il-kontrolli pożittivi, il-kontrolli negattivi u s-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti fid-DMSO 100 % (jew f'solvent xieraq). Imbagħad għandhom jitħejjew dilwizzjonijiet (serjali) xierqa fl-istess solvent. Qabel ma jiġu dissolti, is-sustanzi kollha għandhom jitħallew jekwilibraw għal temperatura ambjentali. Soluzzjonijiet ewlenin imħejjija friski tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test ma għandux ikollhom preċipitat jew dardir notevoli. L-istokks ta' standards referenzjarji u ta' kontroll jistgħu jitħejjew bl-ingrossa. Is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jitħejjew friski qabel kull esperiment. Id-dilwizzjonijiet finali tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jitħejjew friski għal kull esperiment u jintużaw fi żmien 24 siegħa mit-tħejjija.

Is-solubbiltà, iċ-ċitotossiċità u s-sejbien tal-medda.

34. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, tiġi determinata s-solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test fis-solvent tal-għażla. Titħejja konċentrazzjoni stokk massima ta' 0,1 M. F'każ li din il-konċentrazzjoni turi problemi ta' solubbiltà, għandhom jitħejjew anqas soluzzjonijiet ta' stokk sakemm is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu solubilizzati għalkollox. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, jiġu ttestjati dilwizzjonijiet serjali ta' 1:10 tas-sustanza kimika tat-test. Il-konċentrazzjoni massima tal-assaġġ għall-ittestjar tal-agonisti jew tal-antagonisti hi ta' 1 mM. Wara l-iskrinjar ta' qabel, tinkiseb medda ta' konċentrazzjoni rfinata xierqa għas-sustanzi kimiċi tat-test li għandha tiġi ttestjata matul is-sessjonijiet komprensivi. Id-dilwizzjonijiet użati għall-ittestjar komprensiv għandhom ikunu ta' 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x u 3000x.

35. L-ittestjar taċ-ċitotossiċità hu inklużi fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (11). L-ittestjar taċ-ċitotossiċità hu inkorporat kemm fis-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll fis-sessjonijiet komprensivi. Il-metodu użat għall-valutazzjoni taċ-ċitotossiċità matul il-validazzjoni tal-bijoassaġġ ERα CALUX kien it-test tat-tnixxija tal-lattatdeidroġenaži (LDH) flimkien ma' spezzjoni viżwali kwalitattiva taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 4.1) wara l-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test. Madankollu, jistgħu jintużaw metodi kwantitattivi oħra għad-determinazzjoni taċ-ċitotossiċità (eż. assaġġ kalorimetriku bbażat fuq it-tetrażolju (MTT) jew bijoassaġġ CALUX taċ-ċitotossiċità). B'mod ġenerali, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test li juru tnaqqis akbar minn 20 % fil-vijabbiltà taċ-ċelloli jitqiesu ċitotossiċi u għalhekk ma jistgħux jintużaw għall-evalwazzjoni tad-*data*. Fir-rigward tal-assaġġ tat-tnixxija tal-LDG, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test titqies ċitotissika meta l-perċentwal tat-tnixxija tal-LDH ikun ogħla minn 120 %.

▼M8

Esponiment għas-sustanza kimika tat-test u organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ

36. Wara t-tripsinizzazzjoni ta' flask konfluwenti ta' ċelloli kkolturati, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'$1x10^5$ ċelloli /ml f'medium tal-assaġġ ħieles minn estroġenu. Mitt µl f'ċelloli sospiżi mill-ġdid jiġu pjastrati fil-bwejriet interni ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra. Il-bwejriet ta' barra jimtlew b'200 µl ta' Salina Baferjata tal-Fosfat (PBS) (ara l-Figuri 1 u 2). Iċ-ċelloli pjastrati jiġu inkubati minn qabel għal 24 siegħa f'inkubatur tas-CO_2 (5 % CO_2, 37°C, 100 % umdità).

37. Wara l-inkubazzjoni minn qabel, il-pjastri jiġu spezzjonati għal ċitotossiċità viżwali (ara l-Appendiċi 4.1) għal kontaminazzjoni u għal konfluwenza. Huma biss pjastri li ma juru ebda ċitotossiċità, kontaminazzjoni u li jkollhom tal-anqas konfluwenza ta' 85 % li jintużaw għall-ittestjar. Il-medium għall-bwejriet interni jitneħħa bil-galbu u jiġi sostitwit b'200 µl medium tal-assaġġ ħieles mill-estroġenu li jkun fih serje ta' dilwizzjonijiet xierqa tal-istandards referenzjarji, tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tal-kontrollib'solvent (Tabella 5: studji agonisti; Tabella 6: studji antagonisti). L-istandards referenzjarji, is-sustanzi kimiċi tat-test, il-kontrolli pożittivi, il-kontrolli negattivi u l-kontrolli b'solvent kollha jiġu ttestjati fi triplikat. Fil-Figura 1 tingħata t-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar tal-agonisti. Fil-Figura 2 tingħata t-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar tal-antagonisti. It-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar ta' qabel l-iskrinjar u għall-ittestjar komprensiv hi identika. Għall-ittestjar tal-antagonisti, il-bwejriet interni kollha, ħlief għall-bwejriet tal-kontroll b'veikolu (VC), ikun fihom ukoll konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol ($3*10^{-12}$ M). Kun af li l-istandards referenzjarji C8 u C4 għandhom jiżdiedu ma' kull pjastra tat-TC.

38. Wara l-esponiment taċ-ċelloli għas-sustanzi kimiċi kollha, il-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra għandhom jiġu inkubati għal 24 siegħa oħra f'inkubatur tas-CO_2 (5 % CO_2, 37°C, 100 % umdità).

Figura 1

Tifsila tal-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra għall-iskrinjar ta' qabel u għall-valutazzjoni tal-effett agonistiku.

Pjastra 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Pjastri sussegwenti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = solvent tal-istandard referenzjarju.

C(1-8) = serje ta' dilwizzjonijiet (1-8, konċentrazzjonijiet baxxi sa għoljin) tal-istandard referenzjarju.

▼**M8**

PC = kontroll pożittiv.

NC = kontroll negattiv.

TCx-(1-8) = dilwizzjonijiet (1-8, konċentrazzjonijiet baxxi sa għoljin) tas-sustanza kimika tat-test għas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u għall-valutazzjoni tal-effett agonistiku tas-sustanza kimika tat-test x.

SC = kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (idealment l-istess solvent bħal f'C0, iżda jista' jkun minn lott ieħor).

Ċelloli griżi: = Bwejriet ta' barra, mimlija b'200 µl PBS.

Figura 2

Tifsila tal-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra għall-iskrinjar antagonistiku ta' qabel u għall-valutazzjoni tal-effett antagonistiku.

Pjastra 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Pjastri sussegwenti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (mass)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (mass)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (mass)	
H												

C0 = solvent tal-istandard referenzjarju.

C(1-8) = serje ta' dilwizzjonijiet (1-8, konċentrazzjonijiet baxxi sa għoljin) tal-istandard referenzjarju.

NC = kontroll negattiv.

PC = kontroll pożittiv.

TCx-(1-8) = dilwizzjonijiet (1-8, konċentrazzjonijiet baxxi sa għoljin) tas-sustanza kimika tat-test għas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u għall-valutazzjoni tal-effett agonistiku tas-sustanza kimika tat-test x.

SC = kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (idealment l-istess solvent bħal f'C0, iżda jista' jkun minn lott ieħor).

VC = kontroll b'veikolu (kontroll b'solvent mingħajr konċentrazzjoni fissa ta' standard referenzjarju agonist 17β-estradjol).

Ċelloli griżi: = Bwejriet ta' barra, mimlija b'200 µl PBS.

Nota: il-bwejriet interni kollha, ħlief għall-bwejriet tal-kontroll b'veikolu (VC), ikun fihom ukoll konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol (3,0*10-12 M)

Kejl tal-luminexxenza

39. Il-kejl tal-luminexxenza hu deskritt fid-dettall fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (10). Il-medium mill-bwejriet għandu jitneħħa u ċ-ċelloli għandhom jiġu liżati wara 24 siegħa inkubazzjoni biex il-membrana taċ-ċelloli tinfetaħ u tkun tista' titkejjel l-attività tal-luċiferaži.

▼M8

40. Għall-kejl tal-luminexxenza, din il-proċedura teħtieġ luminometru mgħammar b'2 injetturi. Ir-reazzjoni tal-luċiferaži tinbeda b'injezzjoni tal-substrat luċiferina. Ir-reazzjoni titwaqqaf biż-żieda ta' 0,2 M NaOH. Ir-reazzjoni titwaqqaf biex tipprevjeni l-ġarr tal-luminexxenza minn bwejra għall-oħra.

41. Id-dawl emess minn kull bwejra jiġi espress bħala Unitajiet tad-Dawl Relattivi (RLUs) għal kull bwejra.

Sessjoni ta' qabel l-iskrinjar

42. Ir-riżultati tal-analiżi ta' qabel l-iskrinjar jintużaw biex tiġi determinata medda ta' konċentrazzjoni rfinuta ta' sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv. L-evalwazzjoni tar-riżultati tal-analiżi ta' qabel l-iskrinjar u d-determinazzjoni tal-medda ta' konċentrazzjoni rfinuta tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv hi deskritta fil-fond fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (10). Hawnhekk jingħata sommarju qasir tal-proċeduri għad-determinazzjoni tal-medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar tal-agonisti u tal-antagonisti. Ara t-Tabelli 5 u 6 għal gwida dwar it-tifsila tad-dilwizzjoni serjali.

L-għażla tal-konċentrazzjonijiet għall-valutazzjoni tal-effetti agonistiċi

43. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu ttestjati bl-użu tas-sensiliet ta' dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabelli 5 (agoniżmu) u 6 (antagoniżmu). Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom jiġu ttestjati fi bwejriet triplikati skont it-tifsila tal-pjastra kif indikata fil-Figura 1 (agoniżmu) jew 2 (antagoniżmu).

44. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabella 3) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerġgħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje sħiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje sħaħ tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerġgħu jiġu analizzati.

45. Il-meded ta' konċentrazzjoni inizjali tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu aġġustati u s-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha tiġi ripetuta f'każ:

— li tiġi osservata ċitotossiċità. Il-proċedura ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir b'konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

— l-iskrinjar minn qabel tas-sustanza kimika tat-test ma jurix kurva ta' doża-rispons sħiħa għaliex il-konċentrazzjonijiet ittestjati jiġġeneraw induzzjoni massima. Is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir billi jintużaw konċentrazzjonijiet inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

46. Meta jiġi osservat rispons validu relatat mad-doża, għandha tingħażel (l-anqas) konċentrazzjoni li fiha tiġi osservata induzzjoni massima u li ma turix ċitotossiċità. L-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi, għandha tkun 3 darbiet din il-konċentrazzjoni magħżula.

47. Serje sħiħa rfinuta ta' dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha titħejja bl-istadji tad-dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabella 5, billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni kif determinata hawn fuq.

▼M8

48. Sustanza kimika tat-test li ma twassalx għal xi effett agonistiku għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni mhux tossika identifikata matul l-iskrinjar ta' qabel.

L-għażla tal-konċentrazzjonijiet għall-valutazzjoni tal-effetti antagonistiċi

49. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabella 4) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerġgħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje sħiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje sħaħ tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerġgħu jiġu analizzati.

50. Il-meded ta' konċentrazzjoni inizjali tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu aġġustati u s-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha tiġi ripetuta f'każ:

— li tiġi osservata ċitotossiċità. Il-proċedura ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir b'konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

— l-iskrinjar minn qabel tas-sustanza kimika tat-test ma jurix kurva ta' doża-rispons sħiħa għaliex il-konċentrazzjonijiet ittestjati jiġġeneraw inibizzjoni massima. Is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir billi jintużaw konċentrazzjonijiet inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

51. Meta jinstab rispons validu relatat mad-doża, għandha tingħażel (l-anqas) konċentrazzjoni li fiha tiġi osservata inibizzjoni massima u li ma turix ċitotossiċità. L-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi, għandha tkun tliet darbiet din il-konċentrazzjoni magħżula.

52. Serje sħiħa rfinata ta' dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha titħejja bl-istadji tad-dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabella 6, billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni kif determinata hawn fuq.

53. Is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jwasslux għal xi effett antagonistiku għandhom jiġu ttestjati fis-sessjonijiet komprensivi billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni mhux tossika ttestjata matul l-iskrinjar ta' qabel.

Sessjonijiet komprensivi

54. Wara l-għażla tal-meded ta' konċentrazzjonijiet irfinuti, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu ttestjati b'mod komprensiv bl-użu tas-sensiliet ta' dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabelli 5 (agoniżmu) u 6 (antagoniżmu). Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom jiġu ttestjati fi bwejriet triplikati skont it-tifsila tal-pjastra kif indikata fil-Figura 1 (agoniżmu) jew 2 (antagoniżmu).

55. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabelli 3 u 4) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerġgħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje sħiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje sħaħ tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerġgħu jiġu analizzati.

▼**M8**

Tabella 5

Il-konċentrazzjoni u d-dilwizzjonijiet tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli u tas-sustanzi kimiċi tat-test użati għall-ittestjar tal-agonisti

Referenza 17β-estradjol		TCx - sessjoni ta' qabel l-iskrinjar		TCx - sessjoni komprensiva		Kontrolli	
konċ. (M)		dilwizzjoni		dilwizzjoni		konċ. (M)	
C0	0	TCx-1	10,000,000 x	TCx-1	3,000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1,000,000 x	TCx-2	1,000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100,000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10,000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1,000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - sustanza kimika tat-test x
PC - kontroll pożittiv (17α-metiltestosteron)
NC - kontroll negattiv (kortikosteron)
C0 - kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju
SC - kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test

▼**M8**

Tabella 6

Il-konċentrazzjoni u d-dilwizzjonijiet tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli u tas-sustanzi kimiċi tat-test użati għall-ittestjar tal-antagonisti

Referenza tamossifen		TCx - sessjoni ta' qabel l-iskrinjar		TCx - sessjoni komprensiva		Kontrolli	
konċ. (M)		dilwizzjoni		dilwizzjoni		konċ. (M)	
C0	0	TCx-1	10,000,000 x	TCx-1	3,000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1,000,000 x	TCx-2	1,000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100,000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10,000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1,000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Agonist supplimentat**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konċ. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradjol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - sustanza kimika tat-test x
PC - kontroll pożittiv (4-idrossitamossifen)
NC - kontroll negattiv (resveratrol)
C0 - kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju
SC - kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test
VC - il-kontroll b'veikolu (ma fihx konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17β-estradjol ($3,0*10^{-12}$ M)

▼M8

Il-ġbir tad-*data* u l-analiżi tad-*data*

56. Wara s-sessjonijiet ta' skrinjar ta' qabel u komprensivi, għandhom jiġu determinati l-EC_{10}, l-EC_{50}, il-PC_{10}, il-PC_{50} u l-induzzjoni massima (TCx_{max}) ta' sustanza kimika tat-test għall-ittestjar agonistiku. Għall-ittestjar antagonistiku, għandhom jiġu kkalkolati l-IC_{20}, l-IC_{50}, il-PC_{80}, il-PC_{50} u l-induzzjoni minima (TCx_{min}). Fil-Figuri 3 (agoniżmu) u 4 (antagoniżmu) tingħata rappreżentazzjoni grafika ta' dawn il-parametri. Il-parametri meħtieġa huma kkalkolati fuq il-bażi tal-induzzjoni relattiva ta' kull sustanza kimika tat-test (relattiva għall-induzzjoni massima tal-istandard referenzjarju (=100 %)). Ir-rigressjoni mhux lineari (pendil varjabbli, 4 parametri) għandha tintuża għall-evalwazzjoni tad-*data* skont l-ekwazzjoni li ġejja:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope)})}$$

Fejn:

X = Log tad-doża jew tal-konċentrazzjoni

Y = Rispons (induzzjoni relattiva (%))

Quċċata = Induzzjoni massima (%)

Qiegħ = Induzzjoni minima (%)

$LogEC_{50}$ = Log tal-konċentrazzjoni li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu

HillSlope = Il-fattur tal-pendil jew il-pendil ta' Hill

57. Id-*data* mhux proċessata mil-luminometru, espressa bħala Unitajiet tad-Dawl Relattivi (RLUs), għandha tiġi trasferita għall-ispreadsheet tal-analiżi tad-*data* mfassla għas-sessjonijiet ta' qabel l-iskrinjar u komprensivi. Id-*data* mhux proċessata għandha tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni kif indikati fit-Tabelli 3A u 3B (agoniżmu) jew 4A u 4B (antagoniżmu). Fil-każ li d-*data* mhux proċessata tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, jitwettqu l-istadji li ġejjin tal-kalkolu biex jiġu determinati l-parametri meħtieġa:

Agoniżmu

— Naqqas l-RLU medja tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tal-istandards referenzjarji.

— Naqqas l-RLU medja għall-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tas-sustanzi kimiċi tat-test.

— Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Issettja l-induzzjoni tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju f'100 %.

— Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju bħala 100 %.

— Evalwa r-riżultati tal-analiżi skont rigressjoni mhux lineari (pendil varjabbli, erba' parametri).

▼**M8**

— Iddetermina l-EC_{50} u l-EC_{10} tal-istandard referenzjarju.

— Iddetermina l-EC_{50} u l-EC_{10} tas-sustanzi kimiċi tat-test.

— Iddetermina l-induzzjoni relattiva massima tas-sustanza kimika tat-test (TC_{max}).

— Iddetermina l-PC_{10} u l-PC_{50} tas-sustanzi kimiċi tat-test.

Għas-sustanzi kimiċi tat-test, kurva ta' doża-rispons sħiħa mhux dejjem tkun tista' tinkiseb minħabba, eż., problemi ta' ċitotossiċità jew ta' solubbiltà. B'ħekk, l-EC_{50}, l-EC_{10} u l-PC_{50} ma jkunux jistgħu jiġu determinati. F'dan, il-każ, il-PC_{10} u t-TC_{max} biss ikunu jistgħu jiġu determinati.

Antagoniżmu

— Naqqas l-RLU medja tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tal-istandards referenzjarji.

— Naqqas l-RLU medja tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tas-sustanzi kimiċi tat-test.

— Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Issettja l-induzzjoni tal-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju f'100 %.

— Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju bħala 100 %.

— Evalwa r-riżultati tal-analiżi skont rigressjoni mhux lineari (pendil varjabbli, erba' parametri).

— Iddetermina l-IC_{50} u l-IC_{20} tal-istandard referenzjarju.

— Iddetermina l-IC_{50} u l-IC_{20} tas-sustanzi kimiċi tat-test.

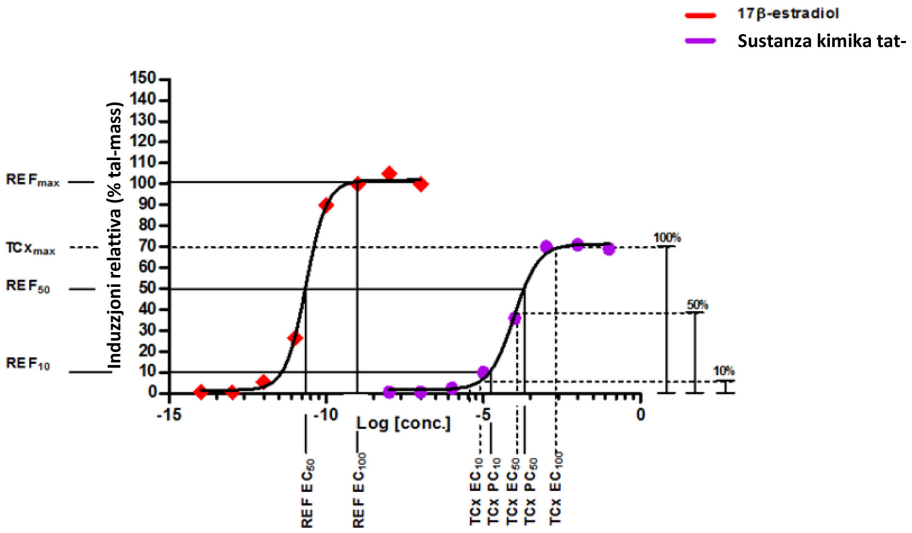
— Iddetermina l-induzzjoni relattiva minima tas-sustanza kimika tat-test (TC_{min}).

— Iddetermina l-PC_{80} u l-PC_{50} tas-sustanzi kimiċi tat-test.

▼M8

Figura 3

Harsa ġenerali lejn il-parametri determinati fl-assaġġ tal-agonisti



EC_{10} = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 10 % tar-rispons massimu tagħha.

EC_{50} = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu tagħha.

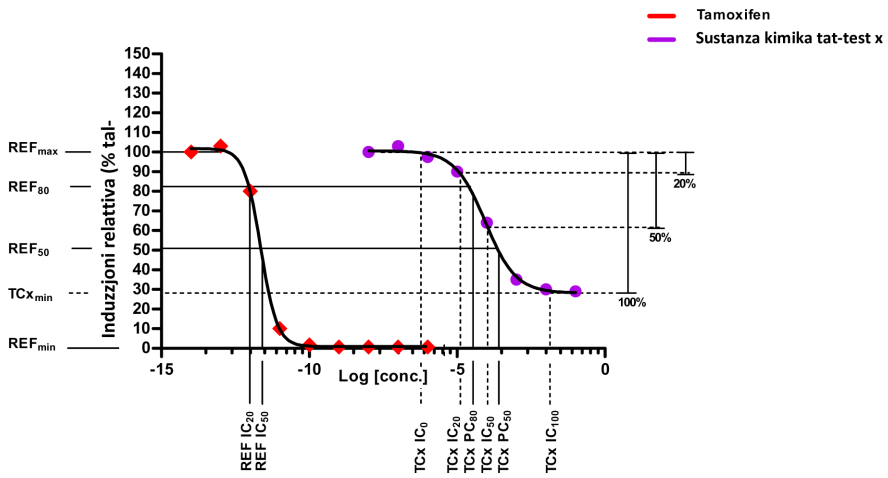
PC_{10} = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-EC_{10} tal-istandard referenzjarju.

PC_{50} = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-EC_{50} tal-istandard referenzjarju.

TCx_{max} = l-induzzjoni relattiva massima tas-sustanza kimika tat-test.

Figura 4

Harsa ġenerali lejn il-parametri determinati fl-assaġġ tal-antagonisti



IC20 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 80 % tar-rispons massimu tagħha (inibizzjoni ta' 20 %).

▼M8

IC50 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu tagħha (inibizzjoni ta' 50 %).

PC80 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-IC20 tal-istandard referenzjarju.

PC50 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-IC50 tal-istandard referenzjarju.

TCxmin = l-induzzjoni relattiva minima tas-sustanza kimika tat-test.

Għas-sustanzi kimiċi tat-test, kurva ta' doża-rispons sħiħa mhux dejjem tkun tista' tinkiseb minħabba, eż., problemi ta' ċitotossiċità jew ta' solubbiltà. B'hekk, l-IC_{50}, l-IC_{20} u l-PC_{50} ma jkunux jistgħu jiġu determinati. F'dan, il-każ, il-PC_{20} u t-TC_{min} biss ikunu jistgħu jiġu determinati.

58. Ir-riżultati għandhom ikunu bbażati fuq żewġ (jew tliet) sessjonijiet indipendenti. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati komparabbli u, għalhekk, riproduċibbli, ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Biex ikunu aċċettabbli, ir-riżultati għandhom:

— Jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (ara l-paragrafi 14-22 dwar il-Kriterji ta' aċċettabbiltà),

— Ikunu riproduċibbli.

Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

59. Għall-interpretazzjoni tad-*data* u d-deċiżjoni dwar jekk sustanza kimika tat-test titqiesx pożittiva jew negattiva, għandhom jintużaw il-kriterji li ġejjin:

Agoniżmu

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **pożittiva** f'każ li:

1 It-TC_{max} tkun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF_{10}).

2 Tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF_{10} jew aktar minnha.

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **negattiva** f'każ li:

1 It-TCmax ma taqbiżx l-10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF10).

2 Anqas minn żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF10 jew aktar minnha.

Antagoniżmu

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **pożittiva** f'każ li:

1 It-TCmin tkun ekwivalenti għal 80 % jew anqas tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF80 = inibizzjoni ta' 20 %).

2 Tal-anqas 2 konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF80 jew anqas minnha.

▼**M8**

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **negattiva** f'każ li:

1 It-TCmin taqbeż it-80 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF80 = inibizzjoni ta' 20 %).

2 Anqas minn żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF80 jew anqas minnha.

60. Biex tiġi karatterizzata l-potenza tar-rispons pożittiv ta' sustanza kimika tat-test, il-kobor tal-effett (agoniżmu: TC_{max}; antagoniżmu: TC_{min}) u l-konċentrazzjoni li fiha jseħħ l-effett (agoniżmu: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagoniżmu: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}) għandhom jiġu rapportati.

RAPPORT TAT-TEST

61. Ara l-paragrafu 20 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER"

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, u van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J u Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V u Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B u Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, u van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M u Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, u Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, u Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, in-Netherlands.

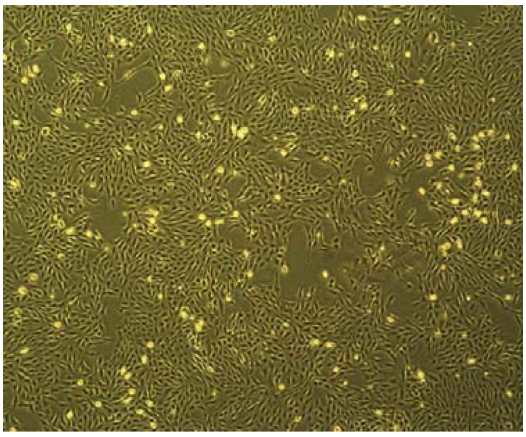
▼**M8**

Appendiċi 4.1

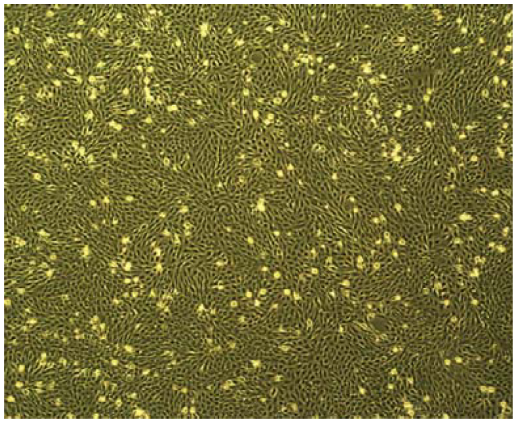
SPEZZJONI VIŻWALI TAL-VIJABBILTÀ TAĊ-ĊELLOLI



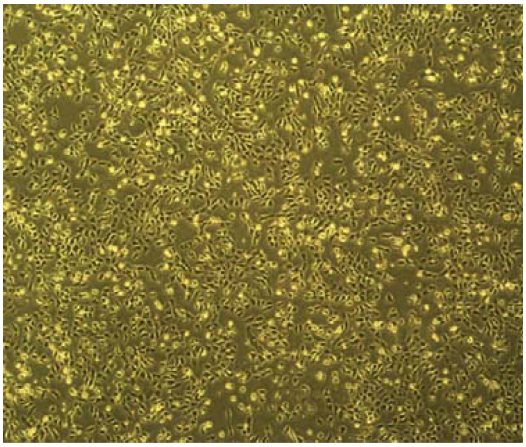
konfluwenza <5 %. Iċ-ċelloli għadhom kif jinżergħu. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 100 %. Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossiċità"



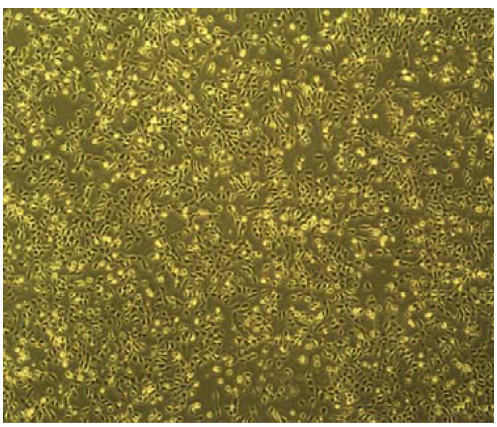
konfluwenza > 85 %. F'dan l-istadju, iċ-ċelloli jkunu esposti għas-sustanzi kimiċi tat-test. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' > 95 %.
Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossiċità"



konfluwenza > 95 %. Iċ-ċelloli jkunu ppakkjati densament u jibdew jikbru b'mod eċċessiv. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' > 95 %.
Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossiċità"



Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' < 25 %. Iċ-ċelloli jinqalgħu minn ma' xulxin u l-kuntatt bejniethom jonqos. Iċ-ċelloli jittondjaw. Klassifikazzjoni: "ċitotossiċità"



vijabbiltà taċ-ċelloli ta' < 5 %. Iċ-ċelloli jinqalgħu minn ma' xulxin għalkollox u l-kuntatt bejniethom jispiċċa. Iċ-ċelloli jittondjaw. Klassifikazzjoni: "ċitotossiċità"

▼M8

B.67 TESTIJIET *IN VITRO* TAL-MUTAZZJONI ĠENETIKA FUQ ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI BL-UŻU TAL-ĠENE TIMIDINA KINAŻI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 490 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati u riveduti kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-ħtiġijiet regolatorji u tat-trattament xieraq tal-annimali. L-assaġġ tal-linfoma tal-ġrieden (MLA) u t-test TK6 bl-użu tal-lokus tat-timidina kinaži (TK) oriġinarjament kienu jinsabu fil-metodu ta' ttestjar B.17. Imbagħad, il-Grupp ta' Ħidma ta' Esperti tal-MLA tal-Grupp ta' Ħidma Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossiċità (IWGT) żviluppa rakkomandazzjonijiet armonizzati fil-livell internazzjonali għall-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-assaġġi u għall-interpretazzjoni tad-*data* għall-MLA (1)(2)(3)(4)(5), u dawn ir-rakkomandazzjonijiet huma inkorporati f'dan il-metodu ta' ttestjar il-ġdid B.67. Dan il-metodu ta' ttestjar hu miktub għall-MLA u, minħabba li juża wkoll il-lokus tat-TK, it-test TK6. Filwaqt li l-MLA ntuża ħafna għal finijiet regolatorji, it-TK6 intuża ferm anqas spiss. Ta' min jinnota li minkejja s-similarità bejn il-punti ta' tmiem, iż-żewġ linji ta' ċelloli mhumiex interkambjabbli u l-programmi regolatorji jistgħu jesprimu validament preferenza għal waħda fuq l-oħra għal użu regolatorju partikolari. Pereżempju, il-validazzjoni tal-MLA wriet ix-xerqien ta' dan għad-detezzjoni mhux biss tal-mutazzjoni ġenika, iżda anki l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi ħsara kromożomika strutturali. Dan il-metodu ta' ttestjar hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppat dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (6).

2. L-iskop tat-testijiet *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi hu li jindividwaw il-mutazzjonijiet ġenetiċi indotti mis-sustanzi kimiċi. Il-linji ta' ċelloli użati f'dawn it-testijiet ikejlu l-mutazzjonijiet 'il quddiem fil-ġeni indikaturi, speċifikament il-ġene timidina kinaži endoġena (*TK* għaċ-ċelloli tal-bniedem u *Tk* għaċ-ċelloli tar-rodituri, kollettivament imsejħa *TK* f'dan il-metodu ta' ttestjar). Dan il-metodu ta' ttestjar hu maħsub biex jintuża b'żewġ linji ta' ċelloli: il-linja ta' ċelloli tal-linfoma tal-ġrieden L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (ġeneralment imsejħa L5178Y) u l-linja ta' ċelloli linfoblastojde umana TK6 (ġeneralment imsejħa TK6). Għalkemm iż-żewġ linji ta' ċelloli jvarjaw minħabba l-oriġini tagħhom, it-tkabbir taċ-ċelloli, l-istatus tal-p53, eċċ., it-testijiet tal-mutazzjoni ġenika *TK* jistgħu jitwettqu b'mod simili fiż-żewġ tipi ta' ċelloli kif deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar.

3. In-natura awtosomali u eterożiguża tal-ġene timidina kinaži tippermetti d-detezzjoni ta' kolonji vijabbli li ċ-ċelloli tagħhom ikunu nieqsa mill-enzima timidina kinaži wara l-mutazzjoni minn $TK^{+/-}$ għal $TK^{-/-}$. Dan in-nuqqas jista' jirriżulta minn avvenimenti ġenetiċi li jaffettwaw il-ġene *TK* inklużi ż-żewġ mutazzjonijiet ġeniċi (mutazzjonijiet puntwali, mutazzjonijiet li jibdlu l-qari tal-kodiċi ġenetiku, tħassiriet żgħar, eċċ.) u avvenimenti kromożomiċi (tħassiriet kbar, riarranġamenti kromożomali u rikombinazzjoni mitotika). Dawn l-avvenimenti msemmija l-aħħar huma espressi bħala telf tal-eterożigożità, li hu tibdil ġenetiku komuni tal-ġeni suppressur tat-tumuri fit-tumoriġenesi umana. Fit-teorija, telf tal-kromożoma sħiħa li ġġorr il-ġene *TK* li tirriżulta mill-indeboliment tal-fus u/jew minn nondisġunzjoni mitotika jista' jiġi individwat fl-MLA. Tabilħaqq, taħlita ta' analiżi ċitoġenika u molekolari turi biċ-ċar li ċerti mutanti tat-TK tal-MLA huma r-riżultat tan-nondisġunzjoni. Madankollu, il-piż tal-evidenza juri li t-testijiet tal-mutazzjoni ġenika *TK* ma jistgħux jindividwaw b'mod affidabbli anewġeni meta jiġu applikati kriterji standard taċ-ċitotossiċità (kif deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar) u għaldaqstant, mhuwiex xieraq li jintużaw dawn it-testijiet biex jiġu individwati anewġeni (7)(8)(9).

▼**M8**

4. Fit-testijiet tal-mutazzjoni ġenika tat-*TK*, jiġu ġenerati żewġ klassijiet fenotipiċi distinti ta' mutanti tat-*TK*; il-mutanti li jikbru normali li jikbru bl-istess rata bħaċ-ċelloli eterożigużi tat-TK, u l-mutanti li jikbru bil-mod li jikbru b'ħinijiet ta' rdoppjar imtawla. Il-mutanti li jikbru normali u dawk li jikbru bil-mod huma rikonoxxuti bħala mutanti ta' kolonja kbira u ta' kolonja żgħira fl-MLA u bħala kolonja li tidher kmieni u bħala mutanti ta' kolonja li tidher tard fit-TK6. In-natura molekolari u ċitoġenetika ta' mutanti tal-MLA ta' kolonji kbar kif ukoll żgħar ġiet esplorata fid-dettall (8)(10)(11)(12)(13). In-natura molekolari u ċitoġenetika tal-mutanti li jidhru kmieni u dawk li jidhru tard tat-TK6 ġiet investigata fil-fond ukoll (14)(15)(16)(17). Mutanti li jikbru bil-mod għaż-żewġ tipi ta' ċelloli ġarrbu ħsara ġenetika li tinvolvi ġene/i regolatorju/i tat-tkabbir putattiv qrib il-locus tat-*TK* li tirriżulta f'ħinijiet ta' rdoppjar imtawla u fil-formazzjoni ta' kolonji li jidhru tard jew żgħar (18). L-induzzjoni ta' mutanti li jikbru bil-mod ġiet assoċjata ma' sustanzi kimiċi li jinduċu tibdiliet strutturali kbar fil-livell kromożomiku. Ċelloli li l-ħsara tagħhom ma tinvolvix il-ġene/i regolatorju/i tat-tkabbir putattiv ħdejn il-lokus tat-TK jikbru b'rati simili għaċ-ċelloli omm u jsiru mutanti li jikbru normali. L-induzzjoni ta' primarjament mutanti li jikbru b'mod normali hi assoċjata ma' sustanzi kimiċi li primarjament jaġixxu bħala mutaġeni puntwali. Konsegwentement, hu essenzjali li jingħaddu kemm il-mutanti li jikbru bil-mod kif ukoll dawk li jikbru normali biex jiġu rkuprati l-mutanti kollha u tiġi pprovduta xi idea dwar it-tip(i) ta' ħsara (mutaġeni vs. klastoġeni) indotta mis-sustanza kimika tat-test (10)(12)(18)(19).

5. Il-metodu ta' ttestjar hu organizzat biex jipprovdi informazzjoni ġenerali li tapplika kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6 u gwida speċjalizzata għat-testijiet individwali.

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Ġeneralment it-testijiet imwettqa *in vitro* jeħtieġu l-użu ta' sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika. Is-sistema esoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*.

8. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati kundizzjonijiet li jistgħu jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali, (jiġifieri interazzjonijiet possibbli mas-sistema tat-test), mhux ikkawżati minn interazzjoni bejn is-sustanza kimika tat-test u l-materjal ġenetiku taċ-ċellola; tali kundizzjonijiet jinkludu tibdiliet fil-pH jew fl-ożmolalità, interazzjoni mal-komponenti tal-medium (20)(21) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossiċità (22)(23)(24). Ċitotossiċità li taqbeż il-livelli massimi rakkomandati ta' ċitotossiċità kif definiti fil-paragrafu 28 titqies eċċessiva għall-MLA u għat-TK6. Barra minn hekk, ta' min jinnota li s-sustanzi kimiċi tat-test li jkunu analogi tat-timidina, jew li jġibu ruħhom bħal analogi tat-timidina jistgħu jżidu l-frekwenza mutanti bit-tkabbir selettiv tal-mutanti ta' sfond spontanji matul it-trattament taċ-ċelloli u jeħtieġu metodi ta' ttestjar addizzjonali għal evalwazzjoni adegwata (25).

9. Għal nanomaterjali manifatturati, jaf ikun hemm bżonn li jsiru adattamenti speċifiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar li ma jkunux deskritti fih.

10. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar ta' taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

▼M8

11. Iċ-ċelloli mutanti nieqsa mill-attività enzimatika tat-timidina kinaži minħabba mutazzjoni *TK*$^{+/-}$ għal *TK*$^{-/-}$ huma reżistenti għall-effetti ċitostatiċi tat-trifluworotimidina (TFT) tal-analogu tal-pirimidina. Iċ-ċelloli profiċjenti huma sensittivi għat-TFT, li toħloq l-inibizzjoni tal-metaboliżmu ċellolari u twaqqaf aktar diviżjoni fiċ-ċelloli. B'hekk, iċ-ċelloli mutanti jkunu kapaċi jipproliferaw fil-preżenza tat-TFT u jifformaw kolonji viżibbli, filwaqt li ċ-ċelloli li fihom l-enzima TK ma jkunux.

PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Iċ-ċelloli f'sospensjoni jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test, kemm b'sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr (ara l-paragrafu 19), għal perjodu xieraq ta' żmien (ara l-paragrafu 33), u mbagħad jiġu subkolturati biex tiġi determinata ċ-ċitotossiċità u titħalla l-espressjoni fenotipika qabel l-għażla tal-mutant. Iċ-ċitotossiċità tiġi determinata bit-tkabbir totali relattiv (RTG—ara l-paragrafu 25) għall-MLA u mis-sopravivenza relattiva (Rs—ara l-paragrafu 26) għat-TK6. Il-kolturi ttrattati jinżammu f'medium tat-tkabbir għal perjodu ta' żmien suffiċjenti, karatteristika ta' kull tip ta' ċellola (ara l-paragrafu 37), biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutazzjonijiet magħmula. Wara l-espressjoni fenotipika, il-frekwenza mutanti tiġi stabbilita biż-żrigħ ta' għadd magħruf ta' ċelloli f'medium li jkun fih l-aġent selettiv biex jiġu żvelati l-kolonji mutanti, u f'medium mingħajr aġent selettiv biex tiġi żvelata l-effiċjenza tal-klonazzjoni (vijabbiltà). Wara perjodu xieraq ta' inkubazzjoni, jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Ċelloli

13. Għall-MLA: Minħabba li l-MLA ġie żviluppat u karatterizzatb l-użu tas-sublinja *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C taċ-ċelloli L5178Y, din is-sublinja speċifika trid tintuża għall-MLA. Il-linja ta' ċelloli L5178Y ġiet derivata minn linfoma timika indotta mill-metilkolantren minn ġurdien DBA-2 (26). Clive u l-kollegi ttrattaw ċelloli L5178Y (imsejħa minn Clive bħala TK$^{+/+}$ -3) bis-sulfonat tal-etilmetan u iżolaw klonu tat-TK$^{-/-}$ (imsejjaħ TK$^{-/-}$ -3.7) billi użaw il-bromodeossiuridina bħala l-aġent selettiv. Mill-klonu tat-TK$^{-/-}$, klonu spontanju TK$^{+/-}$ (imsejjaħ TK$^{+/-}$ -3.7.2.) u subklonu (imsejjaħ TK$^{+/-}$-3.7.2C) ġew iżolati u karatterizzati għall-użu fl-MLA (27). Il-karjotip għal-linja ta' ċelloli ġie ppubblikat (28)(29)(30)(31). In-numru tal-kromożoma modali hu 40. Hemm kromożoma metaċentrika waħda (t12;13) li għandha tingħadd bħala kromożoma waħda. Il-lokus tat-*TK* tal-ġurdien jinsab fit-tarf distali tal-kromożoma 11. Il-linja ta' ċelloli L5178Y *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C għandha mutazzjonijiet fiż-żewġ alleli p53 u tipproduċi proteina p-53 mutanti (32) (33). L-istatus p53 tal-linja ta' ċelloli TK$^{+/-}$-3.7.2C aktarx li hu responsabbli għall-ħila tat-test li jindividwa ħsara fuq skala kbira (17).

14. Għat-TK6: It-TK6 hi linja ta' ċelloli linfoblastojde umana. Il-linja ta' ċelloli omm hi linja ta' ċelloli trasformata b'vajrus Epstein-Barr, WI-L2, li oriġinarjament inkisbet minn tifel ta' ħames snin bi sferoċitoži ereditarja. L-ewwel klonu iżolat, HH4, ġie mutaġenizzat b'ICR191 u ġiet ġenerata linja ta' ċelloli eterożiguża tat-*TK* (34). Iċ-ċelloli TK6 huma kważi diplojdi u l-karjotip rappreżentattiv hu 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Il-lokus tat-*TK* uman jinsab fil-fergħa twila tal-kromożoma 17. It-TK6 hi linja ta' ċelloli kompetenti tal-p53, minħabba li għandha sekwenza p53 tat-tip selvaġġ fiż-żewġ alleli u tesprimi biss il-proteina p53 tat-tip selvaġġ (36).

▼M8

15. Kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6, meta l-ewwel jiġi stabbilit jew rifornit stokk prinċipali, hu rakkomandat li l-laboratorju tal-ittestjar jiżgura n-nuqqas ta' kontaminazzjoni bil-*Mikoplażma*, jagħti karjotip liċ-ċelloli jew jiżbogħ il-kromożomi li jħaddnu l-lokus tat-*TK*, u jivverifikaw il-ħinijiet ta' rdoppjar tal-popolazzjoni. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli għaċ-ċelloli użati fil-laboratorju tal-ittestjar għandu jkun stabbilit u konsistenti mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati (16)(19)(37). Dan l-istokk prinċipali għandu jinħażen f'-150° C jew anqas u jintuża biex jitħejjew l-istokkijiet taċ-ċelloli operatorji kollha.

16. Jew qabel ma jiġi stabbilit numru kbir ta' stokkijiet operatorji krijopreservati jew inkella eżatt qabel l-użu f'esperiment, il-koltura jaf ikollha titnaddaf miċ-ċelloli mutanti preeżistenti [sakemm il-frekwenza tal-mutanti tal-kontroll b'solvent (MF) ma tkunx diġà fi ħdan il-medda aċċettabbli—ara t-Tabella 2 għall-MLA)]. Dan jinkiseb bl-użu tal-metotreksat (*amminopterina*) biex jintgħażlu kontra ċelloli nieqsa mit-TK u jiżdiedu t-timidina, l-ipossantina u l-gliċina (L5178Y) jew 2'-deossiċitidina (TK6) mal-koltura biex jiġi żgurat tkabbir ottimali taċ-ċelloli kompetenti tat-TK (19)(38)(39), u (40) għat-TK6). Parir ġenerali dwar il-prattika tajba għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli kif ukoll parir speċifiku għaċ-ċelloli L5178Y u TK6 jistgħu jinkisbu minn (19)(31)(37)(39)(41). Għal laboratorji li jeħtieġu stokkijiet ta' ċelloli prinċipali biex jibdew l-MLA jew inkella t-TK6 jew biex jiksbu stokkijiet ta' ċelloli prinċipali ġodda, hemm disponibbli repożitorju taċ-ċelloli ta' ċelloli karatterizzati sew (37).

Kundizzjonijiet tal-media tal-koltura

17. Għaż-żewġ testijiet, għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tal-koltura u tal-inkubazzjoni (eż. reċipjenti tal-koltura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO2, temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37 °C) għaż-żamma tal-kolturi. Il-kolturi taċ-ċelloli dejjem għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet li jiżguraw li jkunu qed jikbru fil-fażi log. Hu partikolarment importanti li jintgħażlu kundizzjonijiet tal-media u tal-kolturi li jiżguraw l-iżvilupp ottimali taċ-ċelloli matul il-perjodu ta' espressjoni u klonazzjoni kemm għaċ-ċelloli mutanti kif ukoll għal dawk mhux mutanti. Għall-MLA u għat-TK6, hu importanti wkoll li l-kundizzjonijiet tal-koltura jiżguraw it-tkabbir ottimali kemm tal-mutanti tat-TK ta' kolonji kbar/li jidhru kmieni kif ukoll ta' kolonji żgħar/li jidhru tard. Aktar dettalji dwar il-koltura, inkluża l-ħtieġa li jissaħħan kif suppost is-serum taż-żwiemel inattivat jekk jintuża l-medium tal-RPMI matul l-għażla tal-mutanti, jistgħu jinkisbu minn (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Preparazzjoni tal-kolturi

18. Iċ-ċelloli jiġu propagati minn kolturi omm, miżrugħa fil-medium tat-tkabbir b'densità tali li l-kolturi f'sospensjonijiet jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali matul it-trattament u l-perjodi ta' espressjoni kollha kemm huma.

Attivazzjoni metabolika

19. Għandhom jintużaw sistemi metabolizzanti esoġeni meta jintużaw ċelloli L5178Y u TK6 għaliex għandhom kapaċità metabolika endoġena inadegwata. L-aktar sistema użata spiss, li hi l-ewwel rakkomandata, sakemm ma jkunx ġustifikat mod ieħor, hi frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imħejjija mill-fwied ta' rodituri (ġeneralment firien) trattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (43)(44)(45) jew taħlita ta' fenobarbital u ta' β-naftoflavon (46)(47)(48)(49)(50)(51). Din it-taħlita msemmija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes (52) u ntwera li hi effettiva daqs

▼M8

Aroclor1254 għall-induzzjoni ta' ossidażijiet b'funzjoni mħallta (45)(46)(47)(48)(49). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1-2 % (v/v) iżda tista' tiżdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-għażla tat-tip u l-konċentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena jew induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi kimiċi tat-test.

Preparati tas-sustanza kimika tat-test

20. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 21). Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokolli standard, bħat-trattament f'reċipjenti tal-koltura ssiġillati (53)(54)(55). Il-preparati tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin.

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST

Solventi

21. Is-solvent għandu jingħażel biex tiġi ottimizzata s-solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test mingħajr ma jitħalla impatt avvers fuq it-twettiq tal-assaġġ, e¿. tibdil fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-koltura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Hu rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tat-tkabbir). Fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma jew is-sulfossidu tad-dimetil. Ġeneralment, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbżu l-1 % (v/v) u s-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbżu l-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk jintużaw solventi li ma jkunux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn *data* li tindika l-kompatibbiltà tagħhom mas-sustanzi kimiċi tat-test, mas-sistema tat-test, u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika bil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-*data* ta' sostenn, importanti li jiġu inklużi kontrolli mhux trattati (ara l-Appendiċi 1, Definizzjonijiet) biex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduċi ebda effett dannuż jew mutaġeniku.

KEJL TAĊ-ĊITOTOSSIĊITÀ U GĦAŻLA TAL-KONĊENTRAZZJONIJIET TAT-TRATTAMENT

22. Meta wieħed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva (ara l-paragrafu 28), il-preċipitazzjoni (ara l-paragrafu 29) fil-medium tat-tkabbir, jew bidliet ċari fil-pH jew ożmolalità (ara l-paragrafu 5). Jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tibdil ċar fil-pH tal-medium fi żmien iż-żieda, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali biex jiġu evitati riżultati pożittivi artefattwali u biex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-koltura.

23. L-għażla tal-konċentrazzjoni hi bbażata fuq iċ-ċitotossiċità u fuq kunsiderazzjonijiet oħra (ara l-paragrafi 27-30). Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità f'test inizjali tista' tkun siewja biex jiġu definiti aħjar il-konċentrazzjonijiet li jkunu se jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex meħtieġ. Anki jekk issir evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità inizjali, il-kejl taċ-ċitotossiċità għal kull koltura xorta waħda jkun meħtieġ fl-esperiment ewlieni. Jekk isir esperiment għas-sejbien tal-medda, dan għandu jkopri firxa wiesgħa ta' konċentrazzjonijiet u jista' jew jiġi terminat fil-jum 1 wara t-trattament jew jibqa' għaddej matul l-espressjoni tal-jum 2 u l-għażla tal-mutanti (jekk jidher li l-konċentrazzjonijiet użati jkunu xierqa).

▼**M8**

24. Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi determinata għal kull koltura tat-test u kull koltura tal-kontroll individwali: il-metodi għall-MLA (2) u għat-TK6 (15) huma definiti bi prattika miftiehma fil-livell internazzjonali.

25. Kemm għall-verżjoni tal-agar kif ukoll għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA: Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi evalwata bl-użu tat-tkabbir totali relattiv (RTG) li orġinarjament ġie definit minn Clive u Spector fl-1975 (2). Dan il-kejl jinkludi l-iżvilupp relattiv f'sospensjoni (RSG: koltura tat-test vs. kontroll b'solvent) matul it-trattament taċ-ċelloli, il-ħin tal-espressjoni u l-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva (RCE): koltura tat-test vs. kontroll b'solvent) fil-ħin li fih jingħażlu l-mutanti (2). Ta' min jinnota li l-RSG jinkludi kwalunkwe telf ta' ċelloli li jseħħ fil-koltura tat-test matul it-trattament (Ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).

26. Għal TK6: Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi evalwata bl-użu tas-sopravivenza relattiva (RS), jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, aġġustata għal kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament, fuq il-bażi tal-għadd taċ-ċelloli, meta mqabbla mal-l-kontroll negattiv (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (Ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

27. Għandhom jiġu evalwati tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inklużi l-kontrolli tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (iċ-ċitotossiċità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Filwaqt li l-użu ta' kolturi duplikati hu rakkomandat, jistgħu jintużaw kolturi repliki jew trattati individwalment f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Ir-riżultati miksuba għall-kolturi rreplikati f'konċentrazzjoni partikolari għandhom jiġu rrapportati b'mod separat iżda jistgħu jiġu aggregati għall-analiżi tad-*data* (55). Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru tossiċità baxxa jew ebda tossiċità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-triplu normalment ikunu xierqa. Meta sseħħ ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet għandhom jintgħażlu biex ikopru l-medda ta' ċitotossiċità minn dik iċ-ċitotossiċità produttiva kif deskritta fil-paragrafu 28 u inklużi konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossiċità moderata u baxxa jew ebda ċitotossiċità. Ħafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons wiqfin u, biex tkun koperta l-medda sħiħa taċ-ċitotossiċità jew biex jiġu studjati l-konċentrazzjoni u r-rispons fid-dettall, jaf ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjonijiet spazjati aktar qrib xulxin u aktar minn erba' konċentrazzjonijiet, speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 43). L-użu ta' aktar minn erba' konċentrazzjonijiet jista' jkun partikolarment importanti meta jintużaw kolturi individwali.

28. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilħaq bejn 20 u 10 % RTG għall-MLA, u bejn 20 u 10 % RS għat-TK6 (paragrafu 67).

29. Għal sustanzi kimiċi tat-test ftit li xejn solubbli li mhumiex ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet anqas mill-anqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajnuna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossiċità sseħħ f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni waħda biss li tipproduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artifattwali mill-preċipitat. Peress li l-MLA u t-TK6 jużaw kolturi ta' sospensjoni, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekkilx it-twettiq tat-test. Id-determinazzjoni tas-solubbiltà fil-medium tat-tkabbir qabel l-esperiment tista' tkun utli wkoll.

▼M8

30. Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossiċità li tillimita, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-anqas (57)(58). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa [jiġifieri Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni mhux magħrufa jew Varjabbli (UVCBs)], estratti ambjentali, eċċ., il-konċentrazzjoni massima jaf ikollha bżonn tkun ogħla (eż. 5 mg/ml), fin-nuqqas ta' biżżejjed ċitotossiċità, biex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wieħed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (59).

Kontrolli

31. Għal kull kundizzjoni sperimentali għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 21) li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u mmaniġġjati bl-istess mod bħall-kolturi tat-trattament.

32. Kontrolli pożittivi konkorrenti huma meħtieġa biex juru l-ħila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' mutaġeni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat, l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena (meta applikabbli), u biex tintwera detezzjoni adegwata ta' mutanti tat-*TK* żgħar/li jidhru tard kif ukoll dawk kbar/li jidhru kmieni. Fit-tabella 1 ta' hawn taħt jingħataw eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll pożittiv oħra, jekk ikunu ġustifikati. Peress li t-testijiet *in vitro* taċ-ċelloli tal-mammiferi huma standardizzati biżżejjed għal trattamenti fuq terminu qasir (minn tlieta sa erba' sigħat) li jsiru b'mod parallel ma' u mingħajr attivazzjoni metabolika bl-użu tal-istess durata tat-trattament, l-użu tal-kontrolli pożittivi jista' jkun limitat għal mutaġenu li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. F'dan il-każ, dan ir-rispons tal-kontroll pożittiv individwali se juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll ir-responsività tas-sistema tat-test. Madankollu, jekk jintuża, trattament fit-tul (jiġifieri 24 siegħa mingħajr S9) għandu jkollu l-kontroll pożittiv tiegħu stess peress li d-durata tat-trattament sejra tvarja mit-test bl-użu tal-attivazzjoni metabolika. Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'konċentrazzjoni waħda jew aktar li tkun mistennija tagħti żidiet riproduċibbli u individwabbli li jispikkaw biex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test, u r-rispons ma għandux ikun imxekkel miċ-ċitotossiċità li taqbeż il-limiti speċifikati f'dan it-TM (ara l-paragrafu 28).

Tabella 1

Sustanzi ta' referenza rakkomandati għall-valutazzjoni tal-profiċjenza tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi

Kategorija	Sustanza	CASRN
1. Mutaġeni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika		
	Metansulfonat tal-metil	66-27-3
	Mitomiċina C	50-07-7
	4-Nitrokinolina-N-Ossidu	56-57-5
2. Mutaġeni li jeħtieġu attivazzjoni metabolika		
	Benżo(a)piren	50-32-8
	Ċiklofosfammid (monoidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetilbenżantraċen	57-97-6
	3-Metilkolantren	56-49-5

▼M8

PROĊEDURA

Trattament bis-sustanza kimika tat-test

33. Ċelloli li jipproliferaw huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika. L-esponiment għandu jkun għal perjodu xieraq ta' żmien (normalment perjodu ta' bejn tlieta u erba' sigħat ikun adegwat). Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (59). Għall-MLA, f'każijiet li fihom it-trattament fuq terminu qasir irendi riżultati negattivi, u jkun hemm informazzjoni li tissuġġerixxi l-ħtieġa ta' trattament itwal [eż. analogi nukleosidiċi, sustanzi kimiċi ftit li xejn solubbli, (5)(59)], għandha tingħata kunsiderazzjoni għat-twettiq tat-test mingħajr trattament aktar fit-tul, jiġifieri 24 siegħa mingħajr S9.

34. In-numru minimu ta' ċelloli użati għal kull koltura tat-test (tal-kontroll u trattata) f'kull stadju fit-test għandu jkun ibbażat fuq il-frekwenza mutanti spontanja. Gwida ġenerali hi li jiġu trattati u passaġġati biżżejjed ċelloli f'kull koltura tal-esperiment biex jinżammu, tal-anqas, 10 iżda, idealment, 100 mutant spontanju f'kull faża tat-test (trattament, espressjoni fenotipika u għażla tal-mutanti) (56).

35. Għall-MLA, il-frekwenza mutanti spontanja aċċettabbli rakkomandata hi ta' bejn 35-140 × 10^{-6} (il-verżjoni tal-agar) u 50-170 × 10^{-6} (il-verżjoni tal-mikropjastri) (ara t-Tabella 2). Biex tal-anqas ikun hemm 10 u, idealment, 100 mutant spontanju li jibqgħu ħajjin wara t-trattament għal kull koltura tat-test, hemm bżonn li tal-anqas jiġu trattati 6 × 10^{6} ċelloli. L-immirar għal dan in-numru ta' ċelloli, u ż-żamma ta' biżżejjed ċelloli matul l-espressjoni u l-klonazzjoni għall-għażla tal-mutanti, jipprovdu għal numru suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) matul kull faża tal-esperiment, anki għall-kolturi trattati f'konċentrazzjonijiet li jirriżultaw f'ċitotossiċità ta' 90 % (kif imkejla minn RTG ta' 10 %) (19)(38)(39).

36. Għat-TK6, il-frekwenza mutanti spontanja ġeneralment tkun ta' bejn 2 u 10 × 10-6. Biex tal-anqas ikun hemm 10 mutanti spontanji li jibqgħu ħajjin wara t-trattament għal kull koltura, hemm bżonn li tal-anqas jiġu trattati 20 × 10^{6} ċelloli. It-trattament ta' dan in-numru ta' ċelloli jipprovdi għal numru suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) anki għall-kolturi trattati f'konċentrazzjonijiet li jikkawżaw ċitotossiċità ta' 90 % matul it-trattament (10 % RS). Barra minn hekk, numru suffiċjenti ta' ċelloli jridu jiġu kolturati matul il-perjodu ta' espressjoni u pjastrati għall-għażla tal-mutanti (60).

Il-ħin tal-espressjoni fenotipika u l-kejl taċ-ċitotossiċità u tal-frekwenza tal-mutanti

37. Fi tmiem il-perjodu tat-trattament, iċ-ċelloli jiġu kolturati għal ħin definit biex tinkiseb espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutanti indotti ġodda; speċifiku għal kull linja ta' ċelloli. Għall-MLA, il-perjodu tal-espressjoni fenotipika hu ta' jumejn (2). Għat-TK6, il-perjodu tal-espressjoni fenotipika hu ta' bejn tlieta u erbat ijiem. Jekk jintuża trattament ta' 24 siegħa, il-perjodu ta' espressjoni jibda wara li jintemm it-trattament.

38. Matul il-perjodu tal-espressjoni fenotipika, iċ-ċelloli jiġu enumerati fuq bażi ta' kuljum. Għall-MLA, l-għadd ta' kuljum taċ-ċelloli jintuża biex jiġi kkalkolati t-tkabbir ta' kuljum tas-sospensjoni (SG). Wara l-perjodu ta' espressjoni ta' jumejn (2), iċ-ċelloli jiġu sospiżi f'medium b'aġent selettiv u mingħajr għad-determinazzjoni tan-numri ta' mutanti (pjastri tal-għażla) u għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (pjastri tal-vijabbiltà), rispettivament. Għall-MLA hemm żewġ metodi aċċettabbli ndaqs għall-klonazzjoni tal-għażla tal-mutanti; wieħed juża l-agar artab u l-ieħor juża medium likwidu fi pjastri b'96 bwejra (19) (38) (39). Il-klonazzjoni fit-TK6 issir bl-użu ta' media likwida u bi pjastra b'96 bwejra (16).

▼M8

39. It-trifluworotimidina (TFT) hi l-uniku aġent selettiv rakkomandat għall-mutanti tat-*TK* (61).

40. Għall-MLA, il-pjastri tal-agar u l-mikropjastri jingħaddu wara inkubazzjoni ta' 10-12-il jum. Għat-TK6, il-kolonji f'mikropjastri jingħataw punteġġ wara 10-14-il jum għall-mutanti li jidhru kmieni. Biex jiġu rkuprati l-mutanti tat-TK6 li jikbru bil-mod (li jidhru tard), hemm bżonn li ċ-ċelloli jiġu magħlufa mill-ġdid b'medium tat-tkabbir u b'TFT wara l-għadd tal-mutanti li jidhru kmieni u mbagħad il-pjastri jridu jiġu inkubati għal 7-10 ijiem addizzjonali (62). Ara l-paragrafi 42 u 44 għal diskussjoni dwar l-enumerazzjoni tal-mutanti tat-*TK* li jikbru bil-mod u normali.

41. Il-kalkoli xierqa għaż-żewġ testijiet inklużi ż-żewġ metodi (agar u mikropjastri) għall-MLA jinsabu fl-Appendiċi 2. Għall-metodu tal-agar tal-MLA, il-kolonji jingħaddu u n-numru ta' kolonji ta' mutanti jiġu aġġustati skont l-effiċjenza tal-klonazzjoni biex tiġi kkalkolata MF. Għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA u tat-TK6, l-effiċjenza tal-klonazzjoni kemm għall-għażla kif ukoll għall-pjastri tal-effiċjenza tal-klonazzjoni tiġi determinata skont id-distribuzzjoni ta' Poisson (63). L-MF tiġi kkalkolata minn dawn iż-żewġ effiċjenzi tal-klonazzjoni.

Karatterizzazzjoni tal-Kolonji tal-Mutanti

42. Għall-MLA, jekk is-sustanza kimika tat-test tkun pożittiva (ara l-paragrafi 62-63), il-karatterizzazzjoni tal-kolonja skont id-daqs tal-kolonja jew it-tkabbir għandha ssir fuq tal-anqas waħda mill-kolturi tat-test (ġeneralment l-ogħla konċentrazzjoni pożittiva aċċettabbli) u fuq il-kontrolli negattivi u pożittivi. Jekk is-sustanza kimika tat-test tkun negattiva (ara l-paragrafu 64), il-karatterizzazzjoni tal-kolonji mutanti għandha ssir fuq il-kontrolli negattivi u pożittivi. Għall-metodu tal-mikropjastri tal-MLA, il-mutanti tal-kolonji żgħar huma definiti bħala dawk li jkopru anqas minn 25 % tad-dijametru tal-bwejra u mutanti tal-kolonji kbar huma dawk li jkopru aktar minn 25 % tad-dijametru tal-bwejra. Għall-metodu tal-agar, jintuża mezz awtomatiku li jgħodd il-kolonji biex jiġu enumerati l-kolonji tal-mutanti u jittieħed id-daqs tal-kolonji. L-approċċi għat-teħid tad-daqs tal-kolonji huma spjegati fid-dettall fid-dokumentazzjoni (19)(38)(40). Il-karatterizazzjoni tal-kolonji fuq il-kontroll negattiv u dak pożittiv hi meħtieġa biex jintwera li l-istudji jitwettqu b'mod adegwat.

43. Is-sustanza kimika tat-test ma tistax tiġi determinata bħala negattiva jekk kemm il-mutanti tal-kolonji kbar kif ukoll dawk żgħar ma jkunux individwati b'mod adegwat fil-kontroll pożittiv. Il-karatterizzazzjoni tal-kolonji tista' tintuża biex tiġi pprovduta informazzjoni ġenerali dwar il-ħila tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża mutazzjonijiet puntwali u/jew avvenimenti kromożomiċi (il-paragrafu 4).

44. TK6: Mutanti li jikbru normali u dawk li jikbru bil-mod huma differenzjati minn differenza fil-ħin ta' inkubazzjoni (ara l-paragrafu 40). Għat-TK6, ġeneralment kemm il-mutanti li jidhru kmieni kif ukoll dawk li jidhru tard jingħataw punteġġ għall-kolturi kollha inklużi l-kontrolli negattivi u pożittivi. Il-karatterizazzjoni tal-kolonji tal-kontroll negattiv u ta' dak pożittiv hi meħtieġa biex jintwera li l-istudji jitwettqu b'mod adegwat. Is-sustanza kimika tat-test ma tistax tiġi determinata bħala negattiva jekk kemm il-mutanti li jidhru kmieni kif ukoll dawk li jidhru tard ma jkunux individwati b'mod adegwat fil-kontroll pożittiv. Il-karatterizzazzjoni tal-kolonji tista' tintuża biex tiġi pprovduta informazzjoni ġenerali dwar il-ħila tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża mutazzjonijiet puntwali u/jew avvenimenti kromożomiċi (il-paragrafu 4).

▼M8

Profiċjenza tal-laboratorju

45. Biex tintwera biżżejjed esperjenza bit-test qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi pożittivi ta' referenza li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti (tal-anqas waħda b'attivazzjoni metabolika u waħda mingħajr magħżula mis-sustanzi elenkati fit-Tabella 1) u diversi kontrolli negattivi (inklużi kolturi mhux trattati u diversi solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontroll pożittiv u negattiv reazzjonijiet għandhom ikunu konsistenti mad-dokumentazzjoni. Dan ir-rekwiżit mhuwiex applikabbli għal laboratorji li jkollhom esperjenza, jiġifieri li jkollhom bażi ta' *data* storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 47-50. Għall-MLA, il-valuri miksuba għall-kontrolli pożittivi kif ukoll għal dawk negattivi għandhom ikunu konsistenti mar-rakkomandazzjonijiet tal-IWGT (ara t-Tabella 2).

46. Għażla ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv (ara t-Tabella 1 fil-paragrafu 25) għandha tiġi investigata bi trattamenti qosra u twal (jekk jintużaw trattamenti twal) fin-nuqqas ta' attivazzjoni metabolika, u anki bit-trattament qasir fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, biex tintwera l-profiċjenza fl-iżvelar ta' sustanzi kimiċi mutaġeniċi, biex tiġi ddeterminata l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u biex tintwera l-adegwatezza tal-kundizzjonijiet tat-tkabbir taċ-ċelloli matul it-trattament, l-espressjoni fenotipika u l-għażla tal-mutanti u tal-proċeduri tal-għoti ta' punteġġ. Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi magħżulin biex jingħataw żidiet riproduċibbli u marbutin mal-konċentrazzjoni li jispikkaw biex jintwerew is-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test.

***Data* storika tal-kontroll**

47. Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv,

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv (mhux trattat, solvent).

48. Meta għall-ewwel tinkiseb id-*data* għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu konsistenti mad-*data* tal-kontroll negattiv ippubblikata. Peress li tiżdied aktar *data* sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (64)(65).

49. Il-bażi ta' *data* storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-anqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (65), biex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u biex juru li l-metodoloġija hi "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (66). Aktar dettalji u rakkomandazzjonijiet dwar kif tibni u tuża d-*data* storika jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (64).

50. Id-*data* ta' kontroll negattiv għandha tikkonsisti fi frekwenzi mutanti minn kolturi individwali jew idealment repliki kif deskritt fil-paragrafu 27. Idealment, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni tal-bażi ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju. Meta d-*data* tal-kontroll negattiv toħroġ mil-limitu ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll dment li din id-*data* ma tkunx eċċezzjoni estrema, ikun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 49) u jkun hemm evidenza ta' ebda żball tekniku jew uman.

▼M8

51. Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tad-*data* mal-bażijiet ta' *data* tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' bażi ta' *data* storika ġdida tal-kontroll.

DATA U RAPPORTAR

Preżentazzjoni tar-riżultati

52. Il-preżentazzjoni tad-*data* għall-MLA kif ukoll għat-TK6 għandha tinkludi, għall-kolturi trattati kif ukoll għal dawk tal-kontroll, id-*data* meħtieġa għall-kalkolu taċ-ċitotossiċità (RTG jew RS, rispettivament) u tal-frekwenzi mutanti, kif deskritti hawn taħt.

53. Għall-MLA, id-data tal-kolturi individwali għandha tiġi pprovduta għall-RSG, għall-RTG, għall-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti u għan-numru ta' kolonji ta' mutanti (għall-verżjoni tal-agar) jew għan-numru ta' bwejriet vojta (għall-verżjoni tal-mikropjastri). L-MF għandha tiġi espressa bħala numru ta' ċelloli mutanti għal kull miljun ċellola li tibqa' ħajja. Jekk ir-rispons ikun pożittiv, l-MFs ta' kolonji żgħar u kbar (u/jew il-perċentwal tal-MF totali) għandhom jingħataw għal tal-anqas konċentrazzjoni waħda tas-sustanza kimika tat-test (ġeneralment l-ogħla konċentrazzjoni pożittiva) u għall-kontrolli negattivi u pożittivi. Fil-każ ta' rispons negattiv, l-MF tal-kolonji żgħar u kbar għandha tingħata għall-kontroll negattiv u għall-kontroll pożittiv.

54. Għat-TK6, id-*data* dwar il-kolturi individwali għandha tiġi pprovduta għall-RS, għall-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti u għan-numru ta' bwejriet vojta għall-mutanti li jidhru kmieni u dawk li jidhru tard. L-MF għandha tiġi espressa bħala numru ta' ċelloli mutanti għal kull numru ta' ċelloli li jibqgħu ħajjin, u għandha tinkludi l-MF totali kif ukoll l-MF (u/jew il-perċentwal tal-MF totali) tal-mutanti li jidhru kmieni u tard.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

55. Kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6, għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji li ġejjin qabel ma jiġu determinati r-riżultati ġenerali għal sustanza kimika tat-test speċifika:

— Saru żewġ kundizzjonijiet sperimentali (trattament qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajr - ara l-paragrafu 33) sakemm waħda ma rriżultatx f'riżultati pożittivi.

— Għandu jkun analizzabbli numru adegwat ta' ċelloli u ta' dożi (ara l-paragrafi 27, 34-36).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 28-30.

Il-kriterji ta' aċċettabbiltà għall-kontrolli negattivi u pożittivi

56. L-analiżi mill-Grupp ta' Ħidma ta' Esperti tal-MLA tal-IWGT ta' ammont estensiv ta' *data* dwar l-MLA sarrfet f'kunsens internazzjonali għal kriterji ta' aċċettabbiltà speċifiċi għall-MLA (1)(2)(3)(4)(5). Għaldaqstant, dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi rakkomandazzjonijiet speċifiċi għad-determinazzjoni tal-aċċettabbiltà tal-kontrolli negattivi u pożittivi u għall-evalwazzjoni tar-riżultati ta' sustanzi individwali fl-MLA. It-TK6 għandha bażi ta' *data* ferm iżgħar u ma saritilhiex evalwazzjoni minn grupp ta' ħidma.

▼M8

57. Għall-MLA, kull esperiment għandu jiġi evalwat dwar jekk il-kontroll mhux trattat/b'solvent jissodisfax il-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-Grupp ta' Ħidma dwar l-MLA tal-IWGT ((4) u t-Tabella 2, hawn taħt): (1) għall-MF (kun af li l-MFs aċċettabbli tal-IWGT huma differenti għall-verżjonijiet tal-agar u tal-mikropjastri tal-MLA), (2) għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) fil-ħin tal-għażla tal-mutanti u (3) għall-iżvilupp f'sospensjoni (SG) għall-kontroll b'solvent (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).

Tabella 2

Il-kriterji ta' aċċettabbiltà għall-MLA

Parametru	Metodu tal-Agar Artab	Metodu tal-Mikropjastri
Frekwenza Mutanti	$35 – 140 \times 10^{-6}$	$50 – 170 \times 10^{-6}$
Effiċjenza tal-Klonazzjoni	65 - 120 %	65 - 120 %
Żvilupp f'Sospensjoni	8 – 32 darba (trattament ta' 3-4 sigħat) 32 – 180 darba (trattament ta' 24 sigħat, jekk isir)	8 – 32 darba (trattament ta' 3-4 sigħat) 32 – 180 darba (trattament ta' 24 sigħat, jekk isir)

58. Għall-MLA, kull test għandu jkun evalwat ukoll dwar jekk il-kontroll(i) pożittiv(i) jissodisfax/jissodisfawx tal-anqas wieħed miż-żewġ kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin żviluppati mill-grupp ta' ħidma tal-IWGT:

— Il-kontroll pożittiv għandu juru żieda assoluta fl-MF totali, jiġifieri żieda ta' aktar mill-MF ta' sfond spontanja [MF indotta (IMF)] ta' tal-anqas 300×10^{-6}. Tal-anqas 40 % tal-IMF għandha tkun riflessa fl-MF tal-kolonja ż-żgħira.

— Il-kontroll pożittiv għandu żieda fl-MF tal-kolonja ż-żgħira ta' tal-anqas 150×10^{-6} ogħla minn dik li dehret fil-kontroll mhux trattat/b'solvent konkorrenti (IMF ta' kolonja żgħira ta' 150×10^{-6}).

59. Għat-TK6, test ikun aċċettabbli jekk il-kontroll negattiv konkorrenti jitqies aċċettabbli għaż-żieda fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafi 48-49. Barra minn hekk, il-kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 32) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv konkorrenti.

60. Għaż-żewġ testijiet, il-limitu superjuri taċ-ċitotossiċità osservat fil-koltura tal-kontroll pożittiv għandu jkun l-istess bħal dak tal-kolturi sperimentali. Jiġifieri, l-RTG/RS ma għandhiex tkun anqas minn 10 %. Biżżejjed li tintuża konċentrazzjoni waħda (jew waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-kolturi tal-kontroll pożittiv jekk tintuża aktar minn konċentrazzjoni waħda) biex jintwera li ġew issodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni għall-kontroll pożittiv. Barra dan, l-MF tal-kontroll pożittiv trid tkun fi ħdan il-medda aċċettabbli stabbilita għal-laboratorju.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

61. Għall-MLA, il-Grupp ta' Ħidma Espert tal-IWGT dwar il-Linfoma fil-Ġrieden (4) għamel ħidma importanti dwar ir-rilevanza bijoloġika u l-kriterji għal rispons pożittiv. Għaldaqstant, dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi rakkomandazzjonijiet speċifiċi għall-interpretazzjoni tar-riżultati tas-sustanzi kimiċi

▼**M8**

tat-test mill-MLA (ara l-paragrafi 62-64). It-TK6 għandha bażi ta' *data* ferm iżgħar u ma saritilhiex evalwazzjoni minn grupp ta' ħidma. Għaldaqstant, ir-rakkomandazzjonijiet għall-interpretazzjoni tad-*data* għat-TK6 huma mogħtija f'termini aktar ġenerali (ara l-paragrafi 65-66). Rakkomandazzjonijiet addizzjonali japplikaw għaż-żewġ testijiet (ara l-paragrafi 67-71).

MLA

62. Approċċ għad-definizzjoni tar-risponsi pożittiv u negattivi hu rakkomandat biex jiġi żgurat li l-MF miżjuda hi bijoloġikament rilevanti. Minflok l-analiżi statistika ġeneralment użata għal testijiet oħra, dan jibbaża fuq l-użu ta' frekwenza mutanti indotta predefinita (jiġifieri żieda fl-MF ogħla mill-kontroll konkorrenti), imsejħa l-Fattur ta' Evalwazzjoni Globali (GEF), li hu bbażat fuq l-analiżi tad-distribuzzjoni tad-*data* dwar l-MF tal-kontroll negattiv mil-laboratorji parteċipanti (4). Għall-verżjoni tal-agar tal-MLA, il-GEF hu ta' 90×10^{-6} u għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA, il-GEF hu ta' 126×10^{-6}.

63. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva biċ-ċar jekk, f'xi waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati (ara l-paragrafu 33), iż-żieda fl-MF ogħla mill-isfond konkorrenti taqbeż il-GEF u ż-żied tkun relatata mal-konċentrazzjoni (eż. bl-użu ta' test tat-tendenzi). Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li kapaċi tinduċi mutazzjoni f'din is-sistema tat-test.

64. Dment li ma jiġux issodisati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun negattiva ċara jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati kollha (ara l-paragrafu 33), ma jkun hemm ebda rispons relatat mal-konċentrazzjoni jew, jekk ikun hemm żieda fl-MF, din ma taqbiżx il-GEF. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet f'din is-sistema tat-test.

TK6

65. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva ċara jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati (ara l-paragrafu 33):

— tal-anqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti

— iż-żieda hi relatata mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi (ara l-paragrafu 33)

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 48).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi mutazzjoni f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (66)(67).

66. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva ċara jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati kollha (ara l-paragrafu 33):

— l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,

— ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi

▼M8

— ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 48).

Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet f'din is-sistema tat-test.

Għall-MLA kif ukoll għat-TK6:

67. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilħaq RTG/RS ta' bejn 20 u 10 %. Il-kunsens hu li għandha tingħata attenzjoni meta jiġu interpretati riżultati pożittivi li jinstabu biss f'RTG/RS ta' bejn 20 u 10 % u riżultat ma jitqiesx pożittiv jekk iż-żieda fl-MF tkun seħħet biss f'RTG/RS ta' 10 % jew anqas (jekk evalwati) (2) (59).

68. Hemm xi ċirkustanzi li fihom informazzjoni addizzjonali tista' tassisti fid-determinazzjoni li sustanza kimika tat-test ma tkunx mutaġenika meta ma jkun hemm ebda koltura li turi valur tal-RTG ta' bejn 10-20 % RTG/RS. Dawn is-sitwazzjonijiet huma spjegati kif ġej: (1) Ma jkun hemm ebda evidenza ta' mutaġeniċità (eż. ebda rispons għad-doża, ebda frekwenza mutanti ogħla minn dawk li dehru fil-meded tal-kontroll negattiv konkorrenti jew tal-isfond storiku, eċċ.) f'sensiela ta' punti ta' *data* fi ħdan RTG/RS ta' 100 % sa 20 % u jkun hemm tal-anqas punt ta' *data* wieħed bejn RTG/RS ta' 20 u 25 %. (2) Ma jkun hemm ebda evidenza ta' mutaġeniċità (eż. ebda rispons għad-doża, ebda frekwenza mutanti ogħla minn dawk li dehru fil-meded tal-kontroll negattiv konkorrenti jew tal-isfond storiku, eċċ.) f'sensiela ta' punti ta' *data* bejn RTG/RS ta' 100 % sa 25 % u jkun hemm ukoll punt ta' *data* negattiv ftit anqas minn RTG/RS ta' 10 %. F'dawn iż-żewġ sitwazzjonijiet, ikun jista' jiġi konkluż li s-sustanza kimika tat-test hi negattiva.

69. Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

70. F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq u/jew biex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-*data* għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. It-twettiq ta' esperiment ripetut possibilment bl-użu tal-kundizzjonijiet sperimentali [eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet biex tiżdied il-probabbiltà ta' kisba ta' punti ta' *data* fi ħdan il-medda ta' RTG/RS ta' 10-20 %, l-użu ta' kundizzjonijiet oħra tal-attivazzjoni metabolika (jiġifieri l-konċentrazzjoni tal-S9 jew l-oriġini tal-S9) u d-durata tat-trattament] jista' jkun utli.

71. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi. Għaldaqstant, ir-rispons tas-sustanza kimika tat-test għandu jiġi konkluż bħala ekwivoku (interpretat bħala bl-istess probabbiltà li jkun pożittiv jew negattiv).

RAPPORT TAT-TEST

72. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

▼**M8**

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solvent:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;

— il-perċentwal ta' solvent fil-medium tat-tkabbir finali.

Ċelloli:

Għal kolturi prinċipali tal-Laboratorju:

— it-tip u s-sors taċ-ċelloli, u l-istorja fil-laboratorju tal-ittestjar;

— il-karatteristiċi tal-karjotip u/jew in-numru modali tal-kromożomi;

— il-metodi għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli;

— l-assenza tal-mikoplażma;

— il-ħinijiet għall-irdoppjar taċ-ċelloli.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— il-ħsieb wara l-għażla tal-konċentrazzjonijiet u n-numru ta' kolturi taċ-ċelloli; inklużi, eż., *data* dwar iċ-ċitotossiċità u limitazzjonijiet għas-solubbiltà;

— il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni ta' CO_2, il-livell ta' umdità;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tat-tkabbir (eż. µg jew mg/ml jew mM tal-medium tat-tkabbir);

— il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) ta' solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tat-tkabbir;

— it-temperatura ta' inkubazzjoni;

— il-ħin ta' inkubazzjoni;

— id-durata tat-trattament;

— id-densità taċ-ċellula waqt it-trattament;

▼**M8**

— it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-taħlita ta' S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' taħlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tat-tkabbir finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9);

— is-sustanzi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali għal kull kundizzjoni tat-trattament;

— it-tul tal-perjodu ta' espressjoni (inkluż in-numru ta' ċelluli miżrugħa, u skedi ta' subkolturi u ta' tagħlif, jekk ikun xieraq);

— l-identità tal-aġent selettiv u l-konċentrazzjoni tiegħu;

— għall-MLA, il-verżjoni użata (tal-agar jew tal-mikropjastri) għandha tkun indikata

— il-kriterji għall-aċċettabbiltà tat-testijiet;

— il-metodi użati biex jingħadd in-numru ta' ċelloli vijabbli u mutanti;

— il-metodi użati għall-kejl taċ-ċitotossiċità;

— kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossiċità u l-metodu użat;

— id-durata tal-ħinijiet ta' inkubazzjoni wara l-pjastrament;

— definizzjoni ta' kolonji li dwarhom jitqiesu l-qies u t-tip (inklużi kriterji għal kolonji "żgħar" u "kbar", kif xieraq);

— il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

— il-metodi użati biex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità, jekk issir, u l-preċipitazzjoni, jekk rilevanti.

Ir-riżultati:

— in-numru ta' ċelloli ttrattati u n-numru ta' ċelloli subkolturati għal kull koltura;

— il-parametri tat-tossiċità (RTG għall-MLA u RS għat-TK6);

— is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-ħin tad-determinazzjoni;

— in-numru ta' ċelloli pjastrati f'medium selettiv u mhux selettiv;

— in-numru ta' kolonji f'medium mhux selettiv u n-numru ta' kolonji reżistenti f'medium selettiv, u l-frekwenzi mutanti relatati;

— is-sejbien tal-qies tal-kolonja għall-kontrolli negattivi u pożittivi u jekk is-sustanza kimika tat-test tkun pożittiva, tal-anqas konċentrazzjoni waħda, u l-frekwenzi mutanti relatati;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— id-*data* tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) konkorrenti;

— id-*data* tal-kontroll negattiv storiku (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) bil-meded, bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard; in-numru ta' testijiet li fuqhom huma bbażati l-kontrolli storiċi;

▼M8

— analiżijiet statistiċi (għal kolturi individwali u għal repliki raggruppati jekk xieraq), u l-valuri p jekk ikun hemm; u għall-MLA, l-evalwazzjoni tal-GEF.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. u Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. u Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. u Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. u Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. u Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariġi.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. u O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. u Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. u Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., u Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. u Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. u Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. u Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. u Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. u Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. u Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. u Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. u Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. u Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan u M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. u Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. u Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. u Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. u Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. u Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. u Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. u Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. u Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. u Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. u Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. u DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. u Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. u Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. u Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Il-manuskritt għadu qed jitħejja).

(38) Lloyd M. u Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. u Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Fi: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z u Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. u Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. u Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. u Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. u Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. u Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. u De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. u Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. u Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. u Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Fi: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. u Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Il-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes, Programm tan-Nazzjonijiet Uniti għall-Ambjent (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. u McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Fi: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91–103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. u Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. u Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. u Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. u Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponibbli fuq: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. u Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. u Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. u Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. u Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. u Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(67) Fleiss J.L., Levin B. u Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Anewġenu: Kwalunkwe sustanza kimika jew proċess li, meta jinteraġġixxu mal-komponenti taċ-ċiklu tad-diviżjoni taċ-ċellola mitotika u mejotika, iwasslu għal anewplojdija f'ċelloli jew f'organiżmi.

Anewplojdija: Kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Mutaġeni li jissostitwixxu l-koppji tal-bażijiet: Sustanzi kimiċi li jikkawżaw sostituzzjoni tal-koppji tal-bażijiet fid-DNA.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Effiċjenza tal-klonazzjoni: Il-perċentwal ta' ċelloli pjastrati f'densità baxxa li kapaċi jikbru f'kolonja li tista' tingħadd.

Klastoġenu: Kwalunkwe sustanza kimika jew proċess li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi f'popolazzjonijiet ta' ċelloli jew ta' organiżmi.

Ċitotossiċità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar, iċ-ċitotossiċità hi identifikata bħala tnaqqis fit-tkabbir totali relattiv (RTG) jew fis-sopravivenza relattiva (RS) għall-MLA u għat-TK6, rispettivament.

Mutazzjoni 'l quddiem: Mutazzjoni ta' ġene mit-tip parentali għall-forma mutanti li tkun toħloq alterazzjoni jew telf tal-attività enzimatika jew tal-funzjoni tal-proteina kodifikata.

Mutaġeni li jibdlu l-qari tal-kodiċi ġenetiku: Sustanzi li jikkawżaw iż-żieda jew it-tħassir ta' koppji tal-bażijiet individwali jew multipli fil-molekula tad-DNA.

Ġenotossiċi: Terminu ġenerali li jinkludi kull tip ta' ħsara fid-DNA jew kromożomika, inkluż ksur tad-DNA, addotti, riarranġamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew fi ħsara kromożomika stabbli.

Rikombinament mitotiku: Matul il-mitożi, ir-rikombinament bejn kromatidi omologi li possibilment jirriżulta fl-induzzjoni ta' ksur tal-ħajta doppja tad-DNA jew f'telf ta' eterożigożità.

Mutaġeniċi: Jipproduċu tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Frekwenza mutanti (MF): L-għadd ta' ċelloli mutanti osservati diviż bl-għadd ta' ċelloli vijabbli.

Hin tal-espressjoni fenotipika: Il-ħin wara t-trattament li matulu l-alterazzjoni ġenetika tkun fissa fi ħdan il-ġenom u kwalunkwe prodott tal-ġeni preeżistenti jitbattal sal-punt li l-karatteristika fenotipika tinbidel.

Sopravivenza relattiva (RS): RS tintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossiċità relatata mat-trattament fit-TK6. Din hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) relattiva taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament taċ-ċelloli aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kontroll negattiv.

▼M8

Żvilupp relattiv f'sospensjoni (RSG): Għall-MLA, l-iżvilupp relattiv f'sospensjoni totali fuq jumejn tal-koltura tat-test meta mqabbel mal-iżvilupp f'sospensjoni totali fuq jumejn tal-kontroll negattiv/b'solvent (Clive u Spector, 1975). L-RSG għandu jinkludi l-iżvilupp relattiv tal-koltura tat-test meat mqabbla mal-kontroll negattiv/b'solvent matul il-perjodu tat-trattament.

Żvilupp totali relattiv (RTG): L-RTG jintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossiċità relatata mat-trattament fl-MLA. Hu kejl tal-iżvilupp relattiv (għall-kontroll tal-veikolu) tal-kolturi tat-test matul il-fażijiet tat-trattament, tal-espressjoni fuq jumejn u tal-klonazzjoni tal-għażla tal-mutanti tat-test. L-RSG ta' kull koltura tat-test jiġi moltiplikat bl-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva tal-koltura tat-test fil-ħin tal-għażla tal-mutanti u hu espress relattiv għall-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kontroll negattiv/b'solvent (Clive u Spector, 1975).

Frazzjoni tal-fwied S9: Supernatant ta' omoġenat tal-fwied wara ċentrifugazzjoni ta' 9 000g, jiġifieri estratt minn fwied mhux proċessat

Taħlita ta' S9: Taħlita tal-frazzjoni S9 tal-fwied u tal-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metaboliċi.

Żvilupp f'sospensjoni (SG): Iż-żieda tad-drabi fin-numru ta' ċelloli matul il-fażijiet tat-trattament u tal-espressjoni tal-MLA. L-SG hu kkalkolat bil-moltiplikazzjoni taż-żieda tad-drabi fil-jum 1 biż-żieda tad-drabi fil-jum 2 għat-trattament qasir (tlieta jew erba' sigħat). Jekk jintuża trattament fuq 24 siegħa, l-SG ikun iż-żieda tad-drabi matul it-trattament fuq 24 siegħa moltiplikat biż-żidiet tad-drabi fil-jiem 1 u 2 tal-espressjoni.

Kontroll b'solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kolturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent waħdu użat biex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Kontrolli mhux trattati: Kontrolli mhux trattati huma kolturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri la sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu proċessati bl-istess mod bħall-kolturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

▼M8

Appendiċi 2

FORMULI

Ċitotossiċità

Għaż-żewġ verżjonijiet (tal-agar u tal-mikropjastri) tal-MLA

Iċ-ċitotossiċità hi definita bħala l-Iżvilupp Totali Relattiv (RTG) li jinkludi l-Iżvilupp Relattiv f'Sospensjoni (RSG) matul il-perjodu ta' espressjoni ta' jumejn u l-Effiċjenza Relattiva tal-Klonazzjoni (RCE) miksuba fil-ħin tal-għażla tal-mutanti. RTG, RSG u RCE lkoll huma espressi bħala perċentwal.

Kalkolu tal-RSG: L-Iżvilupp f'Sospensjoni wieħed (SG_1) hu r-rata ta' żvilupp bejn il-jum 0 u l-jum 1 (konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 1 / konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 0) u l-Iżvilupp f'Sospensjoni tnejn (SG_2) hu r-rata ta' żvilupp bejn il-jum 1 u l-jum 2 (konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 2 / konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 1). L-RSG hu l-SG totali (SG_1 x SG_2) għall-koltura trattata meta mqabbla mal-kontroll mhux trattat/b'solvent. Jiġifieri: RSG = [$SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}$] / [$SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}$] L-SG_1 għandu jiġi kkalkolat mill-konċentrazzjoni taċ-ċelloli inizjali użata fil-bidu tat-trattament taċ-ċelloli. Dan jagħti rendikont għal kwalunkwe ċitotossiċità differenzjali li sseħħ fil-koltura/i tat-test matul it-trattament taċ-ċelloli.

L-RCE hi l-effiċjenza relattiva tal-klonazzjoni tal-koltura tat-test meta mqabbla mal-effiċjenza relattiva tal-klonazzjoni tal-kontroll mhux trattat/b'solvent miksuba fil-ħin tal-għażla tal-mutanti.

Żvilupp Totali Relattiv (RTG): RTG=RSG x RCE

TK6

Sopravivenza Relattiva (RS):

Iċ-ċitotossiċità hi evalwata bis-sopravivenza relattiva, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %). L-aġġustament għat-telf ta' ċelloli matul it-trattament jista' jiġi kkalkolat bħala:

$$\text{CE Aġġustata} = \text{CE} \times \frac{\textit{Number of cells at the end of treatment}}{\textit{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

L-RS aġġustata għal koltura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$RS = \frac{\textit{Adjusted CE in the treated culture}}{\textit{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

IFrekwenza mutanti kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6

Il-frekwenza mutanti (MF) hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kolonji mutanti f'medium selettiv (CE_M) aġġustata bl-effiċjenza tal-klonazzjoni f'medium mhux selettiv fil-ħin tal-għażla tal-mutanti (CE_V). Jiġifieri, MF=CE_M/CE_V. Il-kalkolu ta' dawn iż-żewġ effiċjenzi tal-klonazzjoni hu deskritt hawn taħt għall-metodi ta' klonazzjoni tal-agar u tal-mikropjastri.

▼**M8**

Verżjoni tal-Agar tal-MLA*:* Fil-verżjoni tal-agar artab tal-MLA, in-numru ta' kolonji fil-pjastra tal-għażla tal-mutanti (C_M) u n-numru ta' kolonji fil-pjastra mhux magħżula jew tal-effiċjenza tal-klonazzjoni (għadd tal-vijabbli) (C_V) jinkisbu bl-għadd dirett tal-kloni. Meta 600 ċellola jiġu pjastrati għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) għall-pjastri tal-għażla tal-mutanti (CE_M) u l-pjastri mhux magħżula jew tal-effiċjenza tal-klonazzjoni (għadd tal-vijabbli) (CE_V) u 3 x 10^6 ċelloli jintużaw għall-għażla tal-mutanti,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Verżjoni tal-Mikropjastri tal-MLA u tat-TK6: Fil-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA, C_M u C_V huma determinati bħala l-moltiplikazzjoni tan-numru totali ta' mikropjastri (TW) u n-numru probabbli ta' kolonji għal kull bwejra (P) fil-mikropjastri.

$C_M = P_M \times TW_M$

$CV = P_V \times TW_V$

Mit-terminu żero tad-distribuzzjoni Poisson (Furth et al., 1981), il-P jingħata permezz ta'

$P = - \ln (EW / TW)$

Fejn, EW huma l-bwejriet vojta u TW huma l-bwejriet totali. Għalhekk,

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

Għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA, il-frekwenzi mutanti ta' kolonji żgħar u kbar jiġu kkalkolati b'mod identiku, bl-użu tan-numru rilevanti ta' bwejriet vojta għal kolonji żgħar u kbar.

Għat-TK6, il-frekwenzi mutanti ta' kolonji żgħar u kbar huma bbażati fuq il-mutanti li jidhru kmieni u li jidhru tard.

▼M8

B.68 **METODU TA' TTESTJAR IN VITRO B'ESPONIMENT GĦAL ĦIN QASIR GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI i) TA' SUSTANZI KIMIĊI LI JINDUĊU ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN U ii) TA' SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW GĦAL ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 491 tal-OECD (2017). Il-metodu ta' ttestjar b'Esponiment għal Ħin Qasir (STE) hu metodu *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi għall-klassifikazzjoni tal-periklu u għat-tikkettar tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn kif ukoll dawk li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal ħsara serja lill-għajnejn jew għal irritazzjoni tal-għajnejn, kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament 1272/2008 tal-Unjoni Ewropea (UE) dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1]).

2. Għal ħafna snin, il-potenzjal ta' periklu għall-għajnejn tas-sustanzi kimiċi ġie evalwat primarjament bl-użu ta' test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (TM B.5 (8), ekwivalenti għat-TG 405 tal-OECD). Ġeneralment hu aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test alternattiv *in vitro* uniku mhu se jkun jista' jieħu post bis-sħiħ it-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek biex ibassar il-medda sħiħa ta' risponsi ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn għall-klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet strateġiċi ta' metodi ta' ttestjar alternattivi użati fi ħdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu kapaċi jieħdu post it-test fuq l-għajnejn tal-fniek (2). L-approċċ minn fuq għal isfel hu mfassal għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jkunu mistennija, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, li jkollhom potenzjal għoli ta' irritazzjoni jew li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn. Għall-kuntrarju, l-approċċ minn isfel għal fuq hu mfassal għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jkunu mistennija, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, li ma jikkawżawx irritazzjoni tal-għajnejn suffiċjenti biex ikunu jeħtieġu klassifikazzjoni. Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-STE mhuwiex meqjus li hu sostitut assolut għat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek, hu xieraq biex jintuża bħala parti minn stratepija ta' ttestjar sekwenzjali għall-klassifikazzjoni u għat-tikkettar regolatorji, bħall-approċċ minn fuq għal isfel/minn isfel għal fuq, biex jiġu identifikati mingħajr testijiet ulterjuri (i) sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Kategorija 1 tas-CLP) u (ii) sustanzi kimiċi (esklużi sustanzi ferm volatili u kull sustanza kimika solida oħra li mhix tensjoattiva) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Ebda Kategorija tas-CLP) (1)(2). Madankollu, sustanza kimika li la tkun imbassra li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Kategorija 1 tas-CLP) u lanqas tal-GHS tan-NU/tal-Ebda Kategorija tas-CLP (ma tinduċix ħsara serja lill-għajnejn u lanqas irritazzjoni tal-għajnejn) skont il-metodu ta' ttestjar STE tkun teħtieġ testijiet addizzjonali biex tiġi stabbilita klassifikazzjoni definittiva. Barra minn hekk, għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel l-użu tal-STE f'approċċ minn isfel għal fuq skont skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn li mhumiex il-GHS tan-NU/is-CLP. L-għażla tal-aktar metodu ta' ttestjar xieraq u l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jiġu kkunsidrati fil-kuntest tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni għal Ħsara Serja lill-Għajnejn u l-Irritazzjoni tal-għajnejn (14).

3. L-iskop ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-għajnejn fuq il-bażi tal-ħila tagħha li tinduċi ċitotossiċità fil-Metodu ta'

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

▼**M8**

ttestjar b'Esponiment għal Ħin Qasir. L-effett ċitotossiku tas-sustanzi kimiċi fuq iċ-ċelloli epiteljali korneali hu modalità ta' azzjoni (MOA) importanti li twassal għal ħsara fl-epitelju korneali u għal irritazzjoni tal-għajnejn. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli fil-metodu ta' ttestjar tal-STE hi vvalutata bil-kejl kwantitattiv, wara l-estrazzjoni miċ-ċelloli, ta' melħ tal-formażan blu prodott miċ-ċelloli ħajjin b'konverżjoni enzimatika tal-kolorant vitali MTT (bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju), magħruf ukoll bħala Bromur tat-Tetrażolju Blu Tjoażolil (3). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli miksuba titqabbel mal-kontroll b'solvent (vijabbiltà relattiva) u tintuża biex jiġi stmat il-periklu potenzjali għall-għajnejn tas-sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata bħala tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP meta ż-żewġ konċentrazzjonijiet ta' 5 % u ta' 0,05 % jirriżultaw f'vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 70 % jew anqas (≤). Għall-kuntrarju, sustanza kimika tiġi mbassra bħala ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP meta ż-żewġ konċentrazzjonijiet ta' 5 % u ta' 0,05 % jirriżultaw f'vijabbiltà taċ-ċelloli ta' aktar minn (>) 70 %.

4. It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jirreferi għal dak li jiġi ttestjat u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-STE għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew ta' taħlitiet. Id-definizzjonijiet huma pprovduti f'dan l-Appendiċi.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

5. Dan il-metodu ta' ttestjar hu bbażat fuq protokoll żviluppat minn Kao Corporation (4), u kien is-suġġett ta' żewġ studji ta' validazzjoni differenti: wieħed mill-Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE) (5) u l-ieħor mill-Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). NICEATM/ICCVAM għamlu rieżami bejn il-pari fuq il-bażi tar-rapporti tal-istudji ta' validazzjoni u dokumenti ta' rieżami ta' sfond fuq il-metodu ta' ttestjar (7).

6. Meta dan jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1), id-*data* miksuba bil-metodu ta' ttestjar tal-STE fuq 125 sustanza kimika (inklużi sustanzi kif ukoll taħlitiet), uriet akkuratezza ġenerali ta' 83 % (104/125), rata ta' pożittivi foloz ta' 1 % (1/86), u rata ta' negattivi foloz ta' 51 % (20/39) meta mqabbel mat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (7). Ir-rata ta' negattivi foloz miksuba mhix kritika f'dan il-kuntest, peress li s-sustanzi kimiċi tat-test kollha li jinduċu vijabbiltà taċ-ċelloli ta' ≤ 70 % f'konċentrazzjoni ta' 5 % u > 70 % f'0,05 % ikunu ttestjati b'mod sussegwenti b'metodi ta' ttestjar *in vivo* oħra validati b'mod adegwat jew, bħala l-aħħar istanza, fit-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji u skont l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali u l-approċċi tal-piż tal-evidenza rakkomandati bħalissa (1) (8). Primarjament ġew ittestjati sustanzi monokostitwenti, għalkemm jeżisti wkoll ammont limitat ta' *data* fuq l-ittestjar ta' taħlitiet. Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda hu teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi u ta' taħlitiet multikostitwenti. Madankollu, qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE ma wera ebda nuqqas speċifiku ieħor meta ntuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi tat-test bħall-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/is-CLP. L-investigaturi jistgħu jikkunsidraw li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar fuq sustanzi kimiċi tat-test, li fih vijabbiltà taċ-ċelloli ta' ≤ 70 % kemm fil-konċentrazzjoni ta' 5 % kif ukoll ta' 0,05 % għandha tiġi aċċettata bħala indikatur ta' rispons li jinduċi ħsara serja lill-għajnejn li għandu jiġi klassifikat bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP mingħajr testijiet ulterjuri.

▼**M8**

7. Meta dan jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn u għal ħsara serja lill-għajnejn (jiġifieri Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP), id-*data* miksuba bil-metodu ta' ttestjar tal-STE fuq 130 sustanza kimika (inklużi sustanzi kif ukoll taħlitiet), uriet akkuratezza ġenerali ta' 85 % (110/130), rata ta' negattivi foloz ta' 12 % (9/73), u rata ta' pożittivi foloz ta' 19 % (11/57) meta mqabbel mat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (7). Jekk sustanzi ferm volatili u sustanzi solidi għajr it-tensjoattivi jiġu esklużi mis-sett tad-*data*, l-akkuratezza ġenerali titjieb għal 90 % (92/102), ir-rata ta' negattivi foloz għal 2 % (1/54), u l-pożittivi foloz għal 19 % (9/48) (7). Konsegwentement, in-nuqqasijiet potenzjali tal-metodu ta' ttestjar tal-STE, meta jintuża biex jidenifika sustanzi kimiċi tat-test li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn u għal ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP) huma rata għolja ta' negattivi foloz għal i) sustanzi volatili ħafna bi pressjoni tal-fwar ta' aktar minn 6 kPa u ii) Sustanzi kimiċi solidi (sustanzi u taħlitiet) għajr tensjoattivi u taħlitiet komposti minn tensjoattivi biss. Sustanzi kimiċi bħal dawn huma esklużi mid-dominju tal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-STE (7).

8. Minbarra s-sustanzi kimiċi msemmija fil-paragrafu 6 u 7, is-sett ta' *data* ġenerat mill-metodu ta' ttestjar tal-STE fih ukoll *data* interna dwar 40 taħlita li, meta mqabbla mat-test tal-għajnejn *in vivo* Draize, wera akkuratezza ta' 88 % (35/40), rata ta' pożittivi foloz ta' 50 % (5/10), u rata ta' negattivi foloz ta' 0 % (0/30) għat-tbassir ta' taħlitiet li ma jeħtiġux klassifikazzjoni skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP (9). Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-STE jista' jiġi applikat biex jidentifika taħlitiet bħala Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP f'approċċ minn isfel għal fuq bl-eċċezzjoni ta' taħlitiet ta' solidi għajr dawk komposti minn tensjoattivi biss bħala estensjoni tal-limitazzjoni tiegħu għal sustanzi solidi. Barra minn hekk, taħlitiet li fihom sustanzi bi pressjoni tal-fwar ogħla min 6kPa għandhom jiġu evalwati b'attenzjoni biex jiġu evitati sottopreviżjonijiet potenzjali, u għandhom ikunu ġustifikati fuq bażi ta' każ b'każ.

9. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE ma jistax jintuża għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test bħall-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, jew tal-Kategorija 2A (irritazzjoni tal-għajnejn) jew 2B (irritazzjoni ħafifa tal-għajnejn) tal-GHS tan-NU, minħabba n-numru konsiderevoli ta' sustanzi kimiċi tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP sottoprevisti bħala l-Kategorija 2, 2A, jew 2B u sustanzi kimiċi ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP previsti b'mod eċċessiv bħala tal-Kategorija 2, 2A, jew 2B (7). Għal dan il-għan, jista' jkun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet b'metodu xieraq ieħor.

10. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE hu xieraq għal sustanzi kimiċi tat-test li jiġu dissolti jew sospiżi b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina fiżjoloġika, 5 % sulfossidu tad-dimetil (DMSO) f'salina, jew f'żejt minerali. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE mhuwiex xieraq għal sustanzi kimiċi tat-test li huma insolubbli jew li ma jistgħux jiġu sospiżi b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina fiżjoloġika, 5 % DMSO f'salina, jew f'żejt minerali. L-użu ta' żejt minerali fil-metodu ta' ttestjar tal-STE hu possibbli minħabba l-esponiment għal ħin qasir. Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-STE hu xieraq għat-tbassir tal-potenzjal ta' periklu għall-għajnejn ta' sustanzi kimiċi tat-test insolubbli fl-ilma (*eż.* alkoħols jew ketoni xaħmin b'katina twila) dment li dawn ma jkunux jistgħu jitħalltu f'tal-anqas wieħed mit-tliet solventi proposti hawn fuq (4).

▼M8

11. It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuża f’dan il-metodu ta’ ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat ([1]) u mhux b’rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta’ ttestjar tal-STE għall-ittestjar ta’ sustanzi u/jew ta’ taħlitiet.

PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Il-metodu ta’ ttestjar tal-STE hu bbażat fuq assaġġ *in vitro* bbażat fuq iċ-ċitotossiċità li jsir fuq monosaff konfluwenti ta’ ċelloli tal-Kornea tal-Fenek ta’ Statens Seruminstitut (SIRC), kolturati f’mikropjastra tal-polikarbonat b’96 bwejra (4). Wara esponiment għal ħames minuti għal sustanza kimika tat-test, iċ-ċitotossiċità tiġi mkejla b’mod kwantitattiv bħala l-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli tal-SIRC bl-użu tal-assaġġ tal-MTT (4). Il-vijabbiltà mnaqqsa taċ-ċelloli tintuża biex tbassar l-effetti avversi potenzjali li jwasslu għal ħsara okulari.

13. Ġie rrapportat li 80 % ta’ soluzzjoni mqattra f’għajn fenek jiġi elimenat permezz tal-borża konġuntivali fi żmien tliet sa erba’ minuti, filwaqt li aktar minn 80 % ta’ soluzzjoni mqattra f’għajn bniedem jiġi eliminat fi żmien minuta sa tnejn (10). Il-metodu ta’ ttestjar tal-STE jipprova japprossima dawn il-ħinijiet ta’ esponiment u jagħmel użu miċ-ċitotossiċità bħala punt ta’ tmiem għall-valutazzjoni tal-firxa tal-ħsara għaċ-ċelloli tal-SIRC wara esponiment għal ħames minuti għas-sustanza kimika tat-test.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

14. Qabel l-użu ta’ rutina tal-metodu ta’ ttestjar tal-STE deskritt f’dan il-metodu ta’ ttestjar, li jaderixxi ma’ dan il-metodu ta’ ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost ħdax-il sustanza rakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-medda sħiħa ta’ risponsi għal ħsara serja lill-għajnejn jew għal irritazzjoni tal-għajnejn fuq il-bażi tar-riżultati ta’ testijiet *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TG 405) u s-sistema ta’ klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1). Kriterji tal-għażla oħra inkludew li s-sustanzi għandhom ikunu kummerċjalment disponibbli, li għandu jkun hemm *data* ta’ referenza *in vivo* ta’ kwalità għolja, u li għandu jkun hemm disponibbli *data in vitro* ta’ kwalità għolja mill-metodu ta’ ttestjar (3). F’sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista’ tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta’ referenza adegwata *in vivo* u *in vitro* disponibbli dment li ma jintużawx l-istess kriterji bħal dawk deskritti hawn.

Tabella 1

Lista ta’ Sustanzi ta’ Profiċjenza

Sustanza	CASRN	Klassi kimika ([1])	Stat fiżiku	Kat. *In Vivo* tal-GHS tan-NU/ tas-CLP ([2])	Solvent fit-test tal-STE	Kat. tal-STE tal-GHS tan-NU/tas-CLP
Klorur tal-benżalkonju (10 %, milwiem)	8001-54-5	Kompost tal-onju	Likwidi	Kategorija 1	Salina	Kategorija 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Likwidi	Kategorija 1	Salina	Kategorija 1

([1]) F’Ġunju 2013, il-Laqgħa Konġunta qablet li, fejn possibbli, issa għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu “sustanza kimika tat-test” li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f’metodi ta’ ttestjar ġodda u aġġornati.

▼**M8**

Sustanza	CASRN	Klassi kimika ([1])	Stat fiżiku	Kat. *In Vivo* tal-GHS tan-NU/ tas-CLP ([2])	Solvent fit-test tal-STE	Kat. tal-STE tal-GHS tan-NU/tas-CLP
Aħmar Aċidu 92	18472-87-2	Kompost eteroċikliku; Kompost tal-bromur; Kompost tal-klorur	Solidu	Kategorija 1	Salina	Kategorija 1
Idrossidu tas-sodju	1310-73-2	Alkali; Sustanza kimika inorganika	Solidu	Kategorija 1 ([3])	Salina	Kategorija 1
Butirolatton	96-48-0	Latton; Kompost eteroċikliku	Likwidi	Kategorija 2A (Kategorija 2 fis-CLP)	Salina	Ma tista' ssir ebda previżjoni
1-Ottanol	111-87-5	Alkoħol	Likwidi	Kategorija 2A/B ([4]) (Kategorija 2 fis-CLP)	Żejt Minerali	Ma tista' ssir ebda previżjoni
Ċiklopentanol	96-41-3	Alkoħol; Idrokarbur, ċikliku	Likwidi	Kategorija 2A/B ([5]) (Kategorija 2 fis-CLP)	Salina	Ma tista' ssir ebda previżjoni
2-Etossietil aċetat	111-15-9	Alkoħol; Eter	Likwidi	Ebda Kategorija	Salina	Ebda Kategorija
Dodekan	112-40-3	Idrokarbur, aċikliku	Likwidi	Ebda Kategorija	Żejt Minerali	Ebda Kategorija
Metilisobutilketon	108-10-1	Ketone	Likwidi	Ebda Kategorija	Żejt Minerali	Ebda Kategorija

▼M8

Sustanza	CASRN	Klassi kimika (1)	Stat fiżiku	Kat. *In Vivo* tal-GHS tan-NU/ tas-CLP (2)	Solvent fit-test tal-STE	Kat. tal-STE tal-GHS tan-NU/tas-CLP
Sulfat tal-1,1-Dimetilgwanidina	598-65-2	Amidina; Kompost tal-kubrit	Solidu	Ebda Kategorija	Salina	Ebda Kategorija

(1) Il-klassijiet kimiċi ġew assenjati bl-użu tal-informazzjoni miksuba mill-pubblikazzjonijiet preċedenti tal-NICEATM u, jekk din ma kinitx disponibbli, bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH®) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina (permezz ta' ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponibbli fuq http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) u tad-determinazzjonijiet tal-istruttura magħmula minn NICEATM.

(2) Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1).

(3) Klassifikazzjoni bħala l-Kat.1 hi bbażata fuq il-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda tal-idrossidu tas-sodju 100 % (elenkat bħala sustanza kimika b'potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda fit-TG 435 tal-OECD) u l-kriterju għall-kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1).

(4) Klassifikazzjoni bħala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri tnejn minn sitta vs erbgħa minn sitt annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi ġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. Is-sett ta' *data in vivo* inkluda żewġ studji bi tliet annimali kull wieħed. Fi studju minnhom tnejn minn tliet annimali wrew effetti fil-jum 7 li kienu jiġġustifikaw klassifikazzjoni tal-Kat. 2A (11), filwaqt li fit-tieni studju l-punti ta' tmiem kollha fit-tliet annimali kollha kemm huma rkupraw għal punteġġ ta' żero sal-jum 7 li ġġustifika klassifikazzjoni tal-Kat. 2B (12).

(5) Klassifikazzjoni bħala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri wieħed minn tlieta vs tnejn minn tliet annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi ġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju *in vivo* kien jinkludi tliet annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-opaċità korneali u l-ħmura konġuntivali f'annimal wieħed irkupraw għal punteġġ ta' żero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkuprax għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' opaċità korneali ta' wieħed u ta' ħmura konġuntivali ta' wieħed (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 14 (11).

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

PROĊEDURA

Preparazzjoni tal-Monosaff Ċellolari

15. Il-linja ta' ċelloli tal-kornea tal-fniek, SIRC, għandha tintuża għat-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-STE. Hu rakkomandat li ċ-ċelloli tal-SRC jinkisbu minn bank taċ-ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection CCL60.

16. Iċ-ċelloli SRC huma kolturati f'37 °C f'5 % CO_2 u atmosfera umidifikata fi flask tal-koltura li fih medium tat-tkabbir li jinvolvi medium essenzjali minimu ta' Eagle (MEM) supplimentat b'10 % serum bovin fetali (FBS), 2 mM L-glutammina, 50–100 unità/ml peniċillina u 50–100 µg/ml streptomiċina. Iċ-ċelloli li saru konfluwenti fil-flask tal-koltura għandhom jiġu separati bl-użu tas-soluzzjoni tal-aċidu tripsina-etilendijamminatetraaċetiku, bl-użu ta' scraper taċ-ċelloli jew mingħajr. Iċ-ċelloli jiġu propagati (eż. minn tnejn sa tliet passaġġi) fi flask tal-koltura qabel ma jintużaw għall-ittestjar ta' rutina, u ma għandhomx isirulhom aktar minn 25 passaġġ mit-taħlil.

17. Iċ-ċelloli li jkunu lesti biex jintużaw għat-test tal-STE mbagħad jitħejjew fid-densità xierqa u jinżergħu fi pjastri b'96 bwejra. Id-densità rakkomandata tat-tiżrigħ taċ-ċelloli hi ta' $6,0 \times 10^3$ ċelloli għal kull bwejra meta ċ-ċelloli jintużaw erbat ijiem wara t-tiżrigħ, jew $3,0 \times 10^3$ ċelloli għal kull bwejra meta ċ-ċelloli jintużaw ħamest ijiem wara t-tiżrigħ, f'volum tal-koltura ta' 200 µl. Iċ-ċelloli użati għat-test tal-STE li jinżergħu f'medium tat-tkabbir fid-densità xierqa jilħqu konfluwenza ta' aktar minn 80 % fil-ħin tal-ittestjar, jiġifieri erba' jew ħamest ijiem wara t-tiżrigħ.

Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u tas-Sustanzi tal-Kontroll

18. L-ewwel għażla tas-solvent għad-dissoluzzjoni jew għas-sospensjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test hi s-salina fiżjoloġika. Jekk is-sustanza kimika tat-test turi solubbiltà baxxa jew ma tkunx tista' tiġi dissolta jew sospiża

▼M8

b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina, 5 % DMSO (CAS#67-68-5) f'salina tintuża bħala s-solvent tat-tieni għażla. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jkunux jistgħu jiġu dissolti jew sospiżi b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina jew f'5 % DMSO f'salina, jintuża żejt minerali (CAS#8042-47-5) bħala solvent tat-tielet għażla.

19. Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew sospiżi b'mod uniformi fis-solvent magħżul f'konċentrazzjoni ta' 5 % (w/w) u jiġu dilwiti ulterjorment b'dilwizzjoni serjali ta' 10 darbiet għal konċentrazzjoni ta' 0,5 % u 0,05 %. Kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata f'konċentrazzjonijiet ta' 5 % kif ukoll ta' 0,05 %. Ċelloli kolturati fil-pjastra b'96 bwejra huma esposti għal 200 µl/bwejra f'konċentrazzjoni ta' 5 % jew ta' 0,05 % tas-soluzzjoni (jew sospensjoni) tas-sustanza kimika tat-test, għal ħames minuti f'temperatura ambjentali. Is-sustanzi kimiċi tat-test (sustanzi monokostitwenti jew sustanzi jew taħlitiet multikostitwenti) jitqiesu bħala sustanzi nodfa u dilwiti jew sospiżi skont il-metodu, indipendentement mill-purità tagħhom.

20. Il-medium tat-tkabbir deskritt fil-paragrafu 16 jintuża bħala kontroll b'medium f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Barra minn hekk, iċ-ċelloli jiġu esposti wkoll għal kampjuni b'kontroll b'solvent f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Is-solventi elenkati fil-paragrafu 18 ġew ikkonfermati li ma għandhom ebda effett avvers fuq il-vijabbiltà taċ-ċelloli SIRC.

21. Fil-metodu ta' ttestjar tal-STE, għandu jintuża 0,01 % Sulfat tal-lauril tas-sodju (SLS) f'salina bħala kontroll pożittiv f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Biex tiġi kkalkolata l-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-kontroll pożittiv, kull pjastra ta' kull ripetizzjoni trid tinkludi wkoll kontroll b'solvent salina.

22. Inbjank hu neċessarju biex jiġi determinat il-kumpens għad-densità ottika u għandu jsir fuq bwejriet li jkun fihom salina baferjata bil-fosfat biss, iżda ebda kalċju u manjeżju (PBS-) jew ċelloli.

23. Kull kampjun (sustanza kimika tat-test f'5 % u f'0,05 %, il-kontroll b'medium, il-kontroll b'solvent, u l-kontroll pożittiv) għandu jiġi ttestjat f'kull ripetizzjoni bl-esponiment taċ-ċelloli għal 200 µl tas-sustanza kimika tat-test jew tal-kontroll xierqa għal ħames minuti f'temperatura ambjentali.

24. Sustanzi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanzi kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew ta' prodotti jikkawżaw irritazzjoni okulari, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' irritazzjoni relattiva ta' irritant okulari fi ħdan medda speċifika ta' risponsi irritanti.

Kejl tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

25. Wara l-esponiment, iċ-ċelloli jinħaslu darbtejn b'200 µl PBS u tiżdied 200 µl soluzzjoni tal-MTT (0,5 mg MTT/ml medium tat-tkabbir). Wara ħin ta' reazzjoni ta' sagħtejn f'inkubatur (37°C, 5 % CO_2), is-soluzzjoni tal-MTT tiġi dekantata, il-formażan MTT jiġi estratt billi jiżdiedu 200 µl aċidu isopropanol idrokloriku 0,04 N għal 60 minuta fid-dlam f'temperatura ambjentali, u l-assorbanza tas-soluzzjoni tal-formażan MTT titkejjel f'570 nm b'apparat għall-qari tal-pjastri. L-intereferenza tas-sustanzi kimiċi tat-test mal-assaġġ tal-MTT (minn koloranti jew riduċenti diretti tal-MTT) isseħħ biss jekk jinżamm ammont sinifikanti ta' sustanzi kimiċi tat-test fis-sistema tat-test wara t-tlaħliħ wara l-esponiment, li hu l-każ għall-kornea umana Rikostitwita 3D jew tat-Tessuti tal-epidermis uman rikostitwit iżda mhuwiex rilevanti għall-kolturi ta' ċelloli 2D użati għall-metodu ta' ttestjar tal-STE.

▼M8

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u tat-Tbassir

26. Il-valuri tad-densità ottika (OD) miksuba għal kull sustanza kimika tat-test imbagħad jintużaw biex tiġi kkalkolata l-vijabbiltà taċ-ċelloli għall-kontroll b'solvent, li tiġi stabbilita għal 100 %. Il-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli tiġi espressa bħala perċentwal u tinkiseb bid-diviżjoni tal-OD tas-sustanza kimika tat-test bl-OD tal-kontroll b'solvent wara t-tnaqqis tal-OD tal-inbjank miż-żewġ valuri.

$$Cell\ viability(\%) = \frac{(OD_{570}\ of\ test\ chemical) - (OD_{570}\ of\ blank)}{(OD_{570}\ solvent\ control) - (OD_{570}\ of\ blank)} \times 100$$

B'mod simili, il-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli ta' kull kontroll b'solvent tiġi espressa bħala perċentwal u tinkiseb bid-diviżjoni tal-OD ta' kull kontroll b'solvent bl-OD tal-kontroll b'medium wara t-tnaqqis tal-OD tal-inbjank miż-żewġ valuri.

27. Għandhom isiru tliet ripetizzjonijiet indipendenti, b'kull waħda li jkun fiha tliet bwejriet repliki (jiġifieri, n=9). Il-medja aritmetika tat-tliet bwejriet għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll b'solvent f'kull ripetizzjoni indipendenti tintuża biex tiġi kkalkolata l-medja aritmetika tal-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli. Il-medja aritmetika finali tal-vijabbiltà taċ-ċelloli tiġi kkalkolata mit-tliet ripetizzjonijiet indipendenti.

28. Il-valuri ta' limitu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) u tas-sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew għal ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP) jingħataw hawnhekk.

Tabella 2

Mudell tat-tbassir tal-metodu ta' ttestjar tal-STE

Vijabbiltà taċ-ċelloli		Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP	Applikabbiltà
F'5 %	F'0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Ebda Kategorija	Sustanzi u taħlitiet, bl-eċċezzjoni ta': i) sustanzi ferm volatili bi pressjoni tal-fwar ta' aktar minn 6 kPa ([1]) u ii) Sustanzi kimiċi solidi (sustanzi u taħlitiet) għajr tensjoattivi u taħlitiet komposti minn tensjoattivi biss
≤ 70 %	> 70 %	Ma tista' ssir ebda previżjoni	Mhux applikabbli
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategorija 1	Sustanzi u taħlitiet ([2])

([1]) Taħlitiet li fihom sustanzi bi pressjoni tal-fwar ogħla min 6kPa għandhom jiġu evalwati b'attenzjoni biex jiġu evitati sottopreviżjonijiet potenzjali, u għandhom ikunu ġustifikati fuq bażi ta' każ b'każ.

([2]) Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba primarjament b'sustanzi monokostitwenti, għalkemm jeżisti wkoll ammont ta' *data* dwar l-ittestjar ta' taħlitiet. Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda hu teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi u ta' taħlitiet multikostitwenti. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

▼M8

Kriterji tal-Aċċettazzjoni

29. Ir-riżultati tat-test huma ġudikati bħala aċċettabbli meta jiġu ssodisfati l-kriterji kollha li ġejjin:

a) Id-densità ottika tal-kontroll b'medium (espost għal medium tat-tkabbir) għandha tkun ta' 0,3 jew aktar wara t-tnaqqis tad-densità ottika tal-inbjank.

b) Il-vijabbiltà tal-kontroll b'solvent għandha tkun 80 % jew aktar relattiva għall-kontroll b'medium. Jekk jintużaw diversi kontrolli b'solvent f'kull ripetizzjoni, kull wieħed minn dawk il-kontrolli għandu juri vijabbiltà taċ-ċelloli akbar minn 80 % biex jiġu kwalitifikati s-sustanzi kimiċi tat-test ittestjati b'dawk is-solventi.

c) Il-vijabbiltà taċ-ċelloli miksuba bil-kontroll pożittiv (0,01 % SLS) għandha tkun fi ħdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika. Il-limiti ta' aċċettazzjoni superjuri u inferjuri għall-kontroll pożittiv għandhom jiġu aġġornati b'mod frekwenti, jiġifieri kull tliet xhur, jew kull darba li jsir test aċċettabbli f'laboratorji fejn it-testijiet isiru b'mod mhux frekwenti (jiġifieri anqas minn darba f'xahar). Meta laboratorju ma jlestix numru suffiċjenti ta' esperimenti biex tiġi stabbilita distribuzzjoni statistikament robusta tal-kontroll pożittiv, hu aċċettabbli li jintużaw il-limiti ta' aċċettazzjoni superjuri u inferjuri stabbiliti mill-iżviluppatur tal-metodu, jiġifieri bejn 21,1 % u 62,3 % skont id-*data* storika tal-laboratorju tiegħu, filwaqt li tinbena distribuzzjoni interna matul l-ewwel testijiet ta' rutina.

d) Id-devjazzjoni standard tal-vijabbiltà finali taċ-ċelloli derivata minn tliet ripetizzjonijiet indipendenti għandha tkun anqas minn 15 % għall-konċentrazzjoni ta' 5 % kif ukoll ta' 0,05 % tas-sustanza kimika tat-test.

Jekk ma jiġix issodisfat wieħed jew aktar minn dawn il-kriterji, ir-riżultati għandhom jiġu injorati u jsiru tliet ripetizzjonijiet indipendenti oħra.

DATA U RAPPORTAR

Data

30. Id-*data* għal kull bwejra individwali (eż. il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli) ta' kull ripetizzjoni kif ukoll il-medja ġenerali, l-SD, u l-klassifikazzjoni jridu jiġu rapportati.

Rapport tat-Test

31. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-reġistru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli skont, pereżempju, l-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn disponibbli;

— L-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, il-LogP, il-piż molekulari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;

▼M8

— Il-puritá, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

Kundizzjonijiet u Proċeduri tal-Metodu ta' Ttestjar

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tal-metodu ta' ttestjar użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, is-sors tagħha, in-numru ta' passaġġi u l-konfluwenza taċ-ċelloli użati għall-ittestjar;

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata;

— In-numru ta' ripetizzjonijiet u ta' repliki użati;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test użati (jekk differenti minn dawk rakkomandati);

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;

— Id-durata tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (jekk differenti minn dik rakkomandata);

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' deċiżjoni użati;

— Referenza għall-medja tal-kontroll pożittiv storiku u għad-Devjazzjoni Standard (SD):

— - Wiri ta' profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza) jew bil-wiri ta' prestazzjoni riproduċibbli tal-metodu ta' ttestjar maż-żmien.

Riżultati

— Għal kull sustanza kimika tat-test u sustanza tal-kontroll, u kull konċentrazzjoni ttestjata, it-tabulazzjoni għandha tingħata għall-valuri indivdiwali tal-OD għal kull bwejra replikata, għall-valuri medji aritmetiċi tal-OD għal kull ripetizzjoni indipendenti, il- % tal-vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull ripetizzjoni indipendenti, u l- % medju aritmetiku finali tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u l-SD fit-tliet ripetizzjonijiet;

— Ir-riżultati għall-medium, għas-solvent u għall-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tal-istudji;

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

— Il-klassifikazzjoni ġenerali derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/-għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

▼**M8**

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) Nazzjonijiet Uniti NU (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Disponibbli fuq: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/Korużjoni Akuta tal-Għajnejn.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS u Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼**M8**

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (13).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għsll-klassi ta' sustanzi ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) *data* ta' sostenn dwar l-effetti magħrufa, u (v) il-potenza magħrufa fil-medda tar-rispons mixtieq.

Approċċ Minn Isfel Għal Fuq: Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li ma teħtieġx klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv)

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Irritazzjoni tal-għajnejn: Il-produzzjoni ta' tibdil fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ ta' wara tal-għajn, li jkun kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "effetti reversibbli fuq l-għajnejn" u mal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon ta' sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' foloz pożittivi: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

Kontroll b'medium: Replika mhux trattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn biex jiġi determinat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

MTT: Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

▼**M8**

OD: Densità Ottika.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tinduċi rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (10).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (13).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (10).

Hsara serja lill-għajnejn: Il-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-għajnejn, jew ta' tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje tal-għajn, li ma jkunux riversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "effetti irreversibbli fuq l-għajn" u mal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

Kontroll b'solvent/veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi proċessat mal-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħra biex jiġi stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (13).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Tensjoattiv: Imsejjaħ ukoll aġent tensjoattiv, dan hu sustanza kimika, bħal deterġent, li tista' tnaqqas it-tensjoni tas-superfiċje ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtella' r-ragħwa jew jippenetra solidi; hu magħruf ukoll bħala aġent li jxarrab.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼**M8**

Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali: Strateġija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi rieżaminata, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell biex jiġi determinat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Approċċ Minn Fuq Għal Isfel: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħra (eżitu negattiv).

Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP: Ara "Ħsara serja lill-għajnejn".

Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP: Ara "Irritazzjoni tal-għajnejn".

Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP: Sustanzi kimiċi li mhumiex klassifikati bħala tal-Kategorija 1 jew 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (jew tal-Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU).

UVCB: sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

▼M8

B.69 **METODU TA' TTESTJAR TAL-EPITELJU BĦALL-KORNEA UMANA RIKOSTITWITA (RhCE) GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI U TIKKETTAR GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW GĦAL ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 492 tal-OECD (2017). *Ħsara serja lill-għajnejn* tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut tal-għajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunux riversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni, kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1]). Skont il-GHS tan-NU u s-CLP ukoll, *irritazzjoni tal-għajnejn* tirreferi għall-produzzjoni ta' tibdil fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ ta' wara tal-għajn, li jkun kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn huma klassifikati bħala tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP, filwaqt li dawk li jinduċu irritazzjoni tal-għajnejn huma klassifikati bħala tal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP. Is-sustanzi kimiċi tat-test mhux klassifikati għal irritazzjoni tal-għajnejn jew għal ħsara serja lill-għajnejn huma definiti bħala dawk li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU u tas-CLP, jiġifieri huma msejħa bħala tal-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP.

2. Il-valutazzjoni ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn tipikament kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju (TM B.5 (2)). L-għażla tal-aktar metodu ta' ttestjar xieraq u l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jiġu kkunsidrati fil-kuntest tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni għal Ħsara Serja lill-Għajnejn u l-Irritazzjoni tal-għajnejn (39).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għal ħsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Juża l-epitelju bħall-kornea umana rikostitwita (RhCE) li jimita mill-qrib il-proprjetajiet istoloġiċi, morfoloġiċi, bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-epitelju korneali uman. Ġew validati erba' metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra, meqjusa xjentifikament validi u adottati bħala t-TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) u B.68 (6) biex jindirizzaw il-punt ta' tmiem tas-saħħa tal-bniedem ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn.

4. F'dan il-metodu ta' ttestjar huma inklużi żewġ testijiet validati li jużaw mudelli RhE kummerċjalment disponibbli. Saru studji ta' validazzjoni għall-valutazzjoni ta' irritazzjoni tal-għajnejn/ħsara serja lill-għajnejn (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) bl-użu ta' EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) u ta' SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Kull wieħed minn dawn it-testijiet jagħmel użu minn binjiet ta' tessut tal-RhCE kummerċjalment disponibbli bħala sistema tat-test, li huma riferiti fit-test li ġej bħala l-Metodi ta' Referenza Validati – VRM 1 u VRM2,

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

▼M8

rispettivament. Minn dawn l-istudji ta' validazzjoni u mir-rieżami bejn il-pari indipendenti tagħhom (9)(12), ġie konkluż li EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT kapaċi jidentifikaw kif suppost sustanzi kimiċi (kemm sustanzi kif ukoll taħlitiet) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU, u t-testijiet ġew rakkomandati bħala xjentifikament validi għal dak l-iskop (13).

5. Bħalissa ġeneralment hu aċċettat li, fil-futur qarib, ebda metodu ta' ttestjar *in vitro* uniku mhu se jkun jista' jieħu post bis-sħiħ it-test tal-għajnejn *in vivo* Draize (2)(14) biex ibassar il-medda sħiħa ta' risponsi ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn għall-klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet strateġiċi ta' diversi metodi ta' ttestjar alternattivi fi ħdan strateġiji ta' ttestjar (sekwenzjali) bħall-approċċ minn Isfel għal Fuq/minn Fuq għal Isfel jaf ikunu kapaċi jieħdu post it-test Draize tal-għajnejn għalkollox (15). L-approċċ minn Isfel għal Fuq (15) hu mfassal biex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija ma tikkawżawx irritazzjoni tal-għajnejn suffiċjenti biex teħtieġ klassifikazzjoni, filwaqt li l-approċċ minn Fuq għal Isfel (15) hu mfassal biex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija tikkawża ħsara serja lill-għajnejn. EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT huma rakkomandati biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn skont (Ebda Kategorija) il-GHS tan-NU/is-CLP mingħajr ittestjar ulterjuri, fi ħdan strateġija ta' ttestjar bħall-approċċ minn Isfel għal Fuq/minn Fuq għal Isfel suġġerit minn Scott *et al.* eż. bħala pass inizjali f'approċċ minn Isfel għal Fuq jew bħala wieħed mill-aħħar passi f'approċċ minn Fuq għal Isfel (15). Madankollu, EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT mhumiex maħsuba biex jagħmlu distinzjoni bejn il-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (ħsara serja lill-għajnejn) u l-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (irritazzjoni tal-għajnejn). Din id-differenzazzjoni se jkollha bżonn tiġi indirizzata minn saff ieħor ta' strateġija tat-test (15). B'hekk, sustanza kimika tat-test li tiġi identifikata bħala waħda li teħtieġ klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn/ħsara serja lill-għajnejn b'EpiOcular™ EIT jew SkinEthic™ HCE EIT se tkun teħtieġ ittestjar addizzjonali (*in vitro* u/jew *in vivo*) biex tinkiseb konklużjoni definittiva (Ebda Kategorija, Kategorija 2 jew Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP), billi jintuża, eż., it-TM B.47, B.48, B.61 jew B.68.

6. L-iskop ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jiddeskrivi l-proċedura użata għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-għajnejn fuq il-bażi tal-ħila tagħha li tinduċi ċitotossiċità f'binja tat-tessut tal-RhCE, kif imkejla mill-assaġġ tal-MTT (16) (ara l-paragrafu 21). Il-vijabbiltà tat-tessut tal-RhCE wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test hi determinata meta dawn jitqabblu ma' tessuti trattati bis-sustanza tal-kontroll negativ (% vijabbiltà), u mbagħad tintuża biex jitbassar il-potenzjal ta' periklu tas-sustanza kimika tat-test għall-għajnejn.

7. Hemm standards tal-prestazzjoni (17) disponibbli biex jiffaċilitaw il-validazzjoni ta' testijiet *in vitro* ġodda jew modifikati bbażati fuq l-RhCE simili għal EpiOcular™ EIT u għal SkinEthic™ HCE EIT, skont il-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 34 (18), u jippermettu għall-emendar puntwali tat-TG 492 tal-OECD għall-inklużjoni tagħhom. Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* (MAD) skont il-ftehim tal-OECD se tkun garantita biss għal testijiet validati skont l-istandards tal-prestazzjoni, jekk dawn it-testijiet ikunu ġew rieżaminati u inklużi fil-linja gwida tat-test korrispondenti mill-OECD.

DEFINIZZJONIJIET

8. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

▼**M8**

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

9. Dan il-metodu ta' ttestjar hu bbażat fuq binjiet tat-tessuti tal-RhCE tridimensjonali kummerċjali li huma prodotti bl-użu ta' keratinoċiti epidermali umani primarji (jiġifieri EpiOcular™ OCL-200) jew ċelloli epiteljali korneali immortalizzati umani (jiġifieri SkinEthic™ HCE/S). Il-binjiet tat-tessuti EpiOcular™ OCL-200 u SkinEthic™ HCE/S RhCE huma simili għall-istruttura tridimensjonali tal-epitelju korneali *in vivo* u huma prodotti bl-użu ta' ċelloli mill-ispeċijiet ta' interess (19)(20). Barra minn hekk, it-testijiet ikejlu b'mod dirett iċ-ċitotossiċità li tirriżulta mill-penetrazzjoni tas-sustanza kimika permezz tal-kornea u mill-produzzjoni ta' ħsara fiċ-ċelloli u fit-tessuti; ir-rispons ċitotossiku mbagħad jiddetermina l-eżitu *in vivo* ġenerali ta' ħsara serja lill-għajnejn/ta' irritazzjoni tal-għajnejn. Il-ħsara fiċ-ċelloli tista' sseħħ b'diversi modalitajiet ta' azzjoni (ara l-paragrafu 20), iżda ċ-ċitotossiċità taqdi rwol mekkanistiku importanti, jekk mhux dak primarju, fid-determinazzjoni tar-rispons ġenerali ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanza kimika, muri *in vivo* primarjament minn opaċità korneali, irite, ħmura konġuntivali u/jew kemoż konġuntivali, indipendentement mill-proċessi fiżikokimiċi li huma fil-bażi tal-ħsara fit-tessuti.

10. Medda wiesgħa ta' sustanzi kimiċi, li tkopri varjetà kbira ta' tipi ta' sustanzi kimiċi, ta' klassijiet ta' sustanzi kimiċi, ta' piżijiet molekolari, ta' LogPs, ta' strutturi ta' sustanzi kimiċi, eċċ., ġiet ittestjata fl-istudju ta' validazzjoni li hu l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Il-bażi ta' *data* ta' validazzjoni ta' EpiOcular™ EIT kien fiha 113-il sustanza kimika b'kollox, li jkopru 95 grupp funzjonali organiku differenti skont analiżi tas-sett ta' għodod tal-QSAR tal-OECD (8). Il-maġġoranza ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienet tirrappreżenta sustanzi monokostitwenti, iżda diversi sustanzi multikostitwenti (inklużi 3 omopolimeri, 5 kopolimeri u 10 kważi polimeri) ġew inklużi wkoll fl-istudju. F'termini tal-istat fiżiku u tal-Kategoriji tal-GHS tan-NU/tas-CLP, il-113-il sustanza kimika ttestjati ġew distribwiti kif ġej: 13-il likwidu tal-Kategorija 1, 15-il solidu tal-Kategorija 1, 6 likwidi tal-Kategorija 2A, 10 solidi tal-Kategorija 2A, 7 likwidi tal-Kategorija 2B, 7 solidi tal-Kategorija 2B, 27 likwidu ta' Ebda Kategorija u 28 solidu ta' Ebda Kategorija (8). Il-bażi ta' *data* ta' validazzjoni ta' SkinEthic™ HCE EIT kien fiha 200 sustanza kimika b'kollox, li jkopru 165 grupp funzjonali organiku differenti (8)(10)(11). Il-maġġoranza ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienet tirrappreżenta sustanzi monokostitwenti, iżda diversi sustanzi multikostitwenti (inklużi 10 polimeri) ġew inklużi wkoll fl-istudju. F'termini tal-istat fiżiku u tal-Kategoriji tal-GHS tan-NU/tas-CLP, il-200-il sustanza kimika ttestjati ġew distribwiti kif ġej: 27 likwidu tal-Kategorija 1, 24 solidu tal-Kategorija 1, 19-il likwidu tal-Kategorija 2A, 10 solidi tal-Kategorija 2A, 9 likwidi tal-Kategorija 2B, 8 solidi tal-Kategorija 2B, 50 likwidu ta' Ebda Kategorija u 53 solidu ta' Ebda Kategorija (10)(11).

11. Dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal sustanzi u għal taħlitiet, u għal solidi, għal likwidi, għal semisolidi u għal xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu mitħuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda pretrattament ieħor tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols ma ġewx ivvalutati fi studju ta' validazzjoni. Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhCE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

12. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan (naturalment jew wara t-trattament) u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejlijiet tal-vijabbiltà tat-tessut u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet. It-tip ta' kontrolli adattati li jistgħu jkunu meħtieġa se jvarja skont it-tip ta' interferenza prodotta mis-sustanza kimika tat-test u l-proċedura użata biex jiġi kwantifikat l-MTT formażan (ara l-paragrafi 36-42).

▼M8

13. Ir-riżultati ġenerati fl-istudji ta' prevalidazzjoni (21)(22) u ta' validazzjoni sħiħa (8)(10)(11) urew li kemm EpiOcular™ EIT kif ukoll SkinEthic™ HCE EIT huma trasferibbli għal laboratorji meqjusa li jkunu għadhom ġodda fit-twettiq tal-assaġġi u li huma wkoll riproduċibbli fi ħdan u bejn il-laboratorji. Fuq il-bażi ta' dawn l-istudji, il-livell ta' riproduċibbiltà f'termini ta' konkordanza tat-tbassiriet li jistgħu jkunu mistennija minn EpiOcular™ EIT minn *data* dwar 113-il sustanza kimika hu fl-ordni ta' 95 % fi ħdan il-laboratorji u ta' 93 % bejn il-laboratorji. Il-livell ta' riproduċibbiltà f'termini ta' konkordanza tat-tbassiriet li jistgħu jkunu mistennija minn SkinEthic™ HCE EIT minn *data* dwar 120 sustanza kimika hu fl-ordni ta' 92 % fi ħdan il-laboratorji u ta' 95 % bejn il-laboratorji.

14. EpiOcular™ EIT jista' jintuża biex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u s-CLP. Fid-dawl tad-*data* miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (8), EpiOcular™ EIT għandu akkuratezza ġenerali ta' 80 % (fuq il-bażi ta' 112-il sustanza kimika), sensittività ta' 96 % (fuq il-bażi ta' 57 sustanza kimika), rata ta' negattivi foloz ta' 4 % (fuq il-bażi ta' 57 sustanza kimika), speċifiċità ta' 63 % (fuq il-bażi ta' 55 sustanza kimika) u rata ta' pożittivi foloz ta' 37 % (fuq il-bażi ta' 55 sustanza kimika), meta mqabbel mad-*data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) klassifikata skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP. Studju li fih 97 formulazzjoni agrokimika likwida ġew ittestjati b'EpiOcular™ EIT wera prestazzjoni simili tal-metodu ta' ttestjar għal dan it-tip ta' taħlitiet kif miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (23). Is-97 formulazzjoni kienu distribwiti kif ġej: 21 tal-Kategorija 1, 19 tal-Kategorija 2A, 14 tal-Kategorija 2B u 43 tal-Ebda Kategorija, klassifikati skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU fuq il-bażi ta' *data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14). Inkisbu akkuratezza ġenerali ta' 82 % (fuq il-bażi ta' 97 formulazzjoni), sensittività ta' 91 % (fuq il-bażi ta' 54 formulazzjoni), rata ta' negattivi foloz ta' 9 % (fuq il-bażi ta' 54 formulazzjoni), speċifiċità ta' 72 % (fuq il-bażi ta' 43 formulazzjoni) u rata ta' pożittivi foloz ta' 28 % (fuq il-bażi ta' 43 formulazzjoni) (23).

15. SkinEthic™ HCE EIT jista' jintuża biex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u s-CLP. Fid-dawl tad-*data* miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (10)(11), SkinEthic™ HCE EIT għandu akkuratezza ġenerali ta' 84 % (fuq il-bażi ta' 200 sustanza kimika), sensittività ta' 95 % (fuq il-bażi ta' 97 sustanza kimika), rata ta' negattivi foloz ta' 5 % (fuq il-bażi ta' 97 sustanza kimika), speċifiċità ta' 72 % (fuq il-bażi ta' 103 sustanzi kimiċi) u rata ta' pożittivi foloz ta' 28 % (fuq il-bażi ta' 103 sustanzi kimiċi), meta mqabbel mad-*data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) klassifikata skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP.

16. Ir-rati ta' negattivi foloz miksuba biż-żewġ testijiet tal-RhCE, b'sustanzi jew inkella b'taħlitiet, jaqgħu fi ħdan il-probabbiltà ġenerali ta' 12 % li s-sustanzi kimiċi jiġu identifikati bħala tal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP u tal-Ebda Kategorija tas-CLP mit-test *in vivo* tal-għajnejn Draize, f'testijiet ripetuti; dan hu dovut għall-varjabbiltà inerenti fi ħdan it-test tal-metodu (24). Ir-rati ta' pożittivi foloz miksuba biż-żewġ metodi ta' ttestjar tal-RhCE b'sustanzi jew inkella b'taħlitiet mhumiex kritiċi fil-kuntest ta' dan il-metodu ta' ttestjar peress li s-sustanzi kimiċi tat-test kollha li jipproduċu vijabbiltà tat-tessuti daqs jew anqas mil-limiti stabbiliti (ara l-paragrafu 44) se jkunu jeħtieġu ttestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra, jew bħala l-aħħar rikors fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ ta' piż tal-evidenza. Dawn il-metodi ta'

▼M8

ttestjar jistgħu jintużaw għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, li bihom għandu jinkiseb riżultat negattiv talli sustanza kimika ma tiġix klassifikata għal irritazzjoni tal-għajnejn u għal ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NUu tas-CLP). Għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel l-użu ta' EpiOcular™ EIT u ta' SkinEthic™ HCE EIT skont skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn li mhumiex il-GHS tan-NU/is-CLP.

17. Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li ma jippermettix għal diskriminazzjoni bejn irritazzjoni tal-għajn/effetti riversibbli fuq l-għajn (Kategorija 2) u ħsara serja lill-għajn/effetti irriversibbli fuq l-għajn (Kategorija 1) kif definiti mill-GHS tan-NU u mis-CLP, u lanqas bejn irritanti tal-għajn (Kategorija 2A fakultattiva) u irritanti ħfief tal-għajn (Kategorija 2B fakultattiva), kif definiti mill-GHS tan-NU (1). Għal dawn l-għanijiet ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra.

18. It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat ([1]) u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-RhCE għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew ta' taħlitiet.

PRINĊIPJU TAT-TEST

19. Is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq il-ġilda ta' tal-anqas żewġ binjiet tat-tessut tal-RhCE tridimensjonali u l-vijabbiltà tat-tessuti titkejjel wara l-esponiment u perjodu inkubazzjoni ta' wara t-trattament. It-tessuti tal-RhCE jiġu rikostitwiti minn keratinoċiti epidermali umani primarji jew minn ċelloli epiteljali korneali immortalizzati umani, li jkunu ġew kolturati għal diversi ġranet biex jifformaw epitelju skwamuż differenzjat ħafna u stratifikat li jkun morfoloġikament simili għal dak li jinstab fil-kornea umana. Il-binja tat-tessut tal-RhCE EpiOcular™ tikkonsisti f'tal-anqas 3 saffi vijabbli ta' ċelloli u f'wiċċ mhux keratinizzat, u turi struttura bħall-kornea analoga għal dik misjuba *in vivo*. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE SkinEthic™ HCE tikkonsisti f'tal-anqas 4 saffi vijabbli ta' ċelloli li jinkludu ċelloli bażali kolonnari, ċelloli transizzjonali tal-ġwienaħ u ċelloli skwamużi superfiċjali simili għal dawk tal-epitelju korneali uman normali (20)(26).

20. Ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn indotta kimikament, manifestata *in vivo* primarjament minn opaċità korneali, minn irite, minn ħmura konġuntivali u/jew minn kemożi konġuntivali, hi r-riżultat ta' diversi avvenimenti li jibdew bil-penetrazzjoni tas-sustanza kimika fil-kornea u/jew fil-konġuntiva u bil-produzzjoni ta' ħsara fiċ-ċelloli. Il-ħsara fiċ-ċelloli tista' sseħħ b'diversi modalitajiet ta' azzjoni, li jinkludu: liżi tal-membrana taċ-ċelloli (eż. minn tensjoattivi, minn solventi organiċi); koagulazzjoni ta' makromolekoli (b'mod partikolari proteini) (eż. minn tensjoattivi, minn solventi organiċi, minn alkalis u minn aċidi); saponifikazzjoni ta' lipidi (eż. minn alkali); u alkilazzjoni jew interazzjonijiet kovalenti oħra b'makromolekoli (eż. minn bliċis, perossidi u alkilaturi) (15)(27)(28). Madankollu, intwera li ċ-ċitotossiċità taqdi rwol mekkanistiku importanti, jekk mhux primarju, fid-determinazzjoni tar-rispons ġenerali għall-ħsara serja lill-għajnejn/għall-irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanza kimika, indipendentement mill-proċessi fiżikokimiċi li huma l-bażi tal-ħsara fit-tessut (29)(30). Barra minn hekk, il-potenzjal ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanza kimika hu primarjament determinat mill-firxa ta'

([1]) F'Ġunju 2013, il-Laqgħa Konġunta tal-OECD qablet li, fejn possibbli, issa għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu "sustanza kimika tat-test" li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f'linji gwida tat-test ġodda u aġġornati tal-OECD.

▼M8

korriment inizjali (31), li tikkorrelata mal-firxa ta' mewt ta' ċelloli (29) u mal-firxa tar-risponsi sussegwenti u tal-eżiti eventwali (32). B'hekk, irritanti ħfief ġeneralment jaffettwat biss l-epitelju korneali superfiċjali, l-irritanti ħfief u moderata jagħmlu ħsara primarjament lill-epitelju u lill-istroma superfiċjali u l-irranti severi jagħmlu ħsara lill-epitelju, lill-istroma fonda u kultant lill-endotelju korneali (30)(33). Il-kejl tal-vijabbiltà tal-binja tat-tessuti tal-RhCE wara l-esponiment topiku għal sustanza kimika tat-test biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP) hu bbażat fuq is-suppożizzjoni li s-sustanzi kimiċi kollha li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn jew irritazzjoni tal-għajnejn jinduċu ċitotossiċità fl-epitelju korneali u/jew fil-konġuntiva.

21. Il-vijabbiltà tat-tessuti tal-RhCE titkejjel b'konverżjoni enzimatika tal-kulurant vitali MTT [Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5- difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil; Numru CAS 298-93-1] miċ-ċelloli vijabbli tat-tessut f'melħ tal-formażan MTT blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (16). Sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar (Ebda Kategorija) tal-GHS tan-NU/tas-CLP huma identifikati bħala dawk li ma jnaqqsux il-vijabbiltà tat-tessuti f'livell anqas minn limitu definit (jiġifieri vijabbiltà tat-tessuti ta' > 60 %, f'EpiOcular™ EIT u fi SkinEthic™ HCE EITL ([1]), jew ta' > 50 %, fi SkinEthic™ HCE EITS ([2])) (ara l-paragrafu 44).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

22. Qabel l-użu ta' rutina ta' testijiet tal-RhCE għal finijiet regolatorji, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jbassru kif suppost il-ħmistax-il sustanza kimika ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħażlu mis-sustanzi kimiċi użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-VRMs (8)(10)(11). L-għażla, sa fejn possibbli, tinkludi sustanzi kimiċi li: (i) ikopru stati fiżiċi differenti; (ii) ikopru l-medda sħiħa ta' risponsi *in vivo* ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn fuq il-bażi ta' riżultati ta' kwalità għolja miksuba fit-test *in vivo* ta' referenza fuq għajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Ebda Kategorija) (1) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tas-CLP (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2 jew Ebda Kategorija); (iii) ikopru d-diversi fatturi *in vivo* tal-klassifikazzjoni (24)(25); (iv) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudju ta' validazzjoni (8)(10)(11); (v) ikopru rappreżentazzjoni tajba u wiesgħa ta' gruppi funzjonali organiċi (8)(10)(11); (vi) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew (8)(10)(11); (vii) huma kkuluriti u/jew riduċenti diretti tal-MTT; (viii) ipproduċew riżultati riproduċibbli fil-metodi ta' ttestjar tal-RhCE matul il-validazzjonijiet tagħhom; (ix) tbassru kif suppost mill-metodi ta' ttestjar tal-RhCE matul l-istudji ta' validazzjoni tagħhom; (x) ikopru l-medda sħiħa ta' risponsi *in vitro* fuq il-bażi ta' *data* ta' kwalità għolja tal-metodi ta' ttestjar tal-RhCE (vijabbiltà ta' 0 sa 100 %); (xi) huma kummerċjalment disponibbli; u (xii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi ta' xiri u/jew ta' rimi. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza kimika elenkata ma tkunx disponibbli jew ma tkunx tista' tintuża għal raġunijiet ġustifikati oħra, tista' tintuża sustanza kimika oħra li tissodisfa l-kriterji deskritti hawn fuq, eż. mis-sustanzi kimiċi użati fil-validazzjoni tal-VRM. Madankollu, devjazzjonijiet bħal dawn għandhom ikunu ġustifikati.

([1]) EITL: EIT għal likwidi fil-każ ta' SkinEthic™ HCE
([2]) EITS: EIT għal solidi fil-każ ta' SkinEthic™ HCE

▼**M8**

Tabella 1

Lista ta' sustanzi kimiċi ta' proficjenza

Isem Kimiku	CASRN	Grupp Funzjonali Organiku (1)	Stat Fiżiku	Vijabbiltà tal-VRM1 (%) (2)	Vijabbiltà tal-VRM2 (%) (3)	Tbassir tal-VRM	Riduċent tal-MTT	Interf. tal-kulur
Kategorija *In Vivo* 1 (4)								
Metiltjoglikolat	2365-48-2	Ester tal-aċidu karbossiliku; Tjoalkoħol	L	10,9±6,4	5,5±7,4	Ma tista' ssir ebda previżjoni	Y (b'saħħtu)	L
Akrilat tal-idrossietil	818-61-1	Akrilat; Alkoħol	L	7,5±4,7 (5)	1,6±1,0	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
2,5-Dimetil-2,5-eżanedjol	110-03-2	Alkoħol	S	2,3±0,2	0,2±0,1	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
Ossalat tas-sodju	62-76-0	Aċidu ossokarbossiliku	S	29,0±1,2	5,3±4,1	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
Kategorija In Vivo 2A (4)								
2,4,11,13-Tetraaża-tetradekan-diimida-mmid, N,N″-bis(4-klorofenil)-3,12-diimino-, di-D-glu-konat (20 %, mil-wiem) (6)	18472-51-0	Aloġenur eteroċikliku aromatiku; Aloġenur tal-aril; Grupp tad-diidrossil; Gwanidina	L	4,0±1,1	1,3±0,6	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	Y (dgħajjef)
Benżoat tas-sodju	532-32-1	Aril; Aċidu karbossiliku	S	3,5±2,6	0,6±0,1	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
Kategorija In Vivo 2B (4)								
Dietil toluammid	134-62-3	Benżammid	L	15,6±6,3	2,8±0,9	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
2,2-Dimetil-3-meti-lenbiċiklo [2.2.1] ettan	79-92-5	Alkan, ramifikat b'karbonju terzjarju; Alken; Biċikloettan; Karboċikli bi ċrieki pont; Ċikloalkan	S	4,7±1,5	15,8±1,1	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
Ebda Kategorija *In Vivo* (4)								
1-Etil-3-metilimida-żolju etilsulfat	342573-75-5	Alkossi; Melħ tal-ammonju; Aril; Imidażol; Sulfat	L	79,9±6,4	79,4±6,2	Ebda Kat	L	L

▼**M8**

Isem Kimiku	CASRN	Grupp Funzjonali Organiku ([1])	Stat Fiżiku	Vijabbiltà tal-VRM1 (%) ([2])	Vijabbiltà tal-VRM2 (%) ([3])	Tbassir tal-VRM	Riduċent tal-MTT	Interf. tal-kulur
Eter tad-dikaprilil	629-82-3	Alkossi; Eter	L	97,8±4,3	95,2±3,0	Ebda Kat	L	L
Butossidu tal-piperonil	51-03-6	Alkossi; Benżo-diossol; Benżil; Eter	L	104,2±4,2	96,5±3,5	Ebda Kat	L	L
Żejt tar-riġnu idro-ġenat tal-glikol tal-polietilen (PEG-40)	61788-85-0	Aċilal; Alkoħol; Allil; Eter	Viskuż	77,6±5,4	89,1±2,9	Ebda Kat	L	L
1-(4-Klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil) urea	101-20-2	Aloġenur eteroċikliku aromatiku; Aloġenur tal-aril; Derivati tal-urea	S	106,7±5,3	101,9±6,6	Ebda Kat	L	L
2,2′-Metilen-bis-(6-(2H-benżotriażol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetra-metilbutil)-fenol)	103597-45-1	Alkan ramifikat b'karbonju kwater-narju; Aromatiku karboċikliku fuż; Eteroċikli saturati fużi; Komposti kwinojdi prekursuri; terz-Butil	S	102,7±13,4	97,7±5,6	Ebda Kat	L	L
Tetrafluworoborat tal-potassju	14075-53-7	Melħ Inorganiku	S	88,6±3,3	92,9±5,1	Ebda Kat	L	L

Abbrevjazzjonijiet:

CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; GHS tan-NU = Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (1); VRM1 = Metodu ta' Referenza Validat, EpiOcular™ EIT; VRM2 = Metodu ta' Referenza Validat, SkinEthic™ HCE EIT; Interf. tal-kulur = interferenza tal-kulur bil-kejl tal-assorbanza standard (Densità Ottika (OD)) tal-formażan MTT.

([1]) Grupp funzjonali organiku assenjat skont analiżi inkorporata tas-Sett ta' Għodod 3.1 tal-OECD (8).

([2]) Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba b'EpiOcular™ EIT fil-EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

([3]) Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba bi SkinEthic™ HCE EIT fl-istudju ta' validazzjoni (10)(11).

([4]) Fuq il-bażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5/OECD TG 405) (2)(14) u bl-użu tal-GHS tan-NU.

([5]) Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fis-CEFIC CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

([6]) Klassifikazzjoni bħala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri 1 minn 3 vs 2 minn 3 annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi ġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju *in vivo* kien jinkludi 3 annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-opaċità korneali f'annimal wieħed irkupraw għal punteġġ ta' żero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkuprax għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' opaċità korneali ta' 1 (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 9.

23. Bħala parti mill-ittestjar tal-profiċjenza, hu rrakkomandat li l-utenti jivverifikaw il-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE (ara l-paragrafi 25, 27 u 30). Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal / jekk idumu biex jaslu. Ladarba test ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun inkisbet u ntweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża test b'rutina, hu rakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

▼M8

PROĊEDURA

24. It-testijiet li bħalissa huma koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar huma l-metodi xjentifikament validi ta' EpiOcular™ EIT u ta' SkinEthic™ HCE EIT (9) (12)(13), imsejħa bħala l-Metodu ta' Referenza Validat (VRM1 u VRM2, rispettivament). Il-Proċeduri Operattivi Standard (SOP) għall-metodi ta' ttestjar tal-RhCE huma disponibbli u għandhom jitħaddmu meta jiġu implimentati u jintużaw il-metodi ta' ttestjar f'laboratorju (34)(35). Il-paragrafi li ġejjin u l-Appendiċi 2 jiddeskrivu l-komponenti u l-proċeduri ewlenin tat-testijiet tal-RhCE.

KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHCE

Kundizzjonijiet ġenerali

25. Iċ-ċelloli rilevanti miksuba mill-bniedem għandhom jintużaw biex jiġi rikostitwit it-tessut tridimensjonali tal-epitelju li jixbah il-kornea, li għandu jkun kompost minn ċelloli stratifikati b'mod progressiv iżda mhux kornifikati. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE titħejja f'inserzjonijiet b'membrana sintetika poruża li minnha n-nutrijenti jkunu jistgħu jgħaddu għaċ-ċelloli. Għandu jkun hemm diversi saffi ta' ċelloli epiteljali vijabbli mhux keratinizzati fl-epitelju rikostitwit li jixbah il-kornea. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandu jkollha s-superfiċje epiteljali f'kuntatt dirett mal-arja biex ikun jista' jseħħ esponiment topiku dirett tas-sustanzi kimiċi tat-test b'mod simili għal kif l-epitelju korneali jkun espost *in vivo*. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tifforma barriera funzjonali b'robustezza suffiċjenti biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi ta' referenza ċitotissiċi, eż. Triton X-100 jew dodeċilsulfat tas-sodju (SDS). Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi vvalidata b'determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment meħtieġ biex titnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (ET_{50}) mal-applikazzjoni ta' sustanza ta' referenza f'konċentrazzjoni speċifikata u fissa (eż. 100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100), jew il-konċentrazzjoni li fiha sustanza ta' referenza tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss (eż. trattament ta' 30 minuta b'50 µl SDS) (ara l-paragrafu 30). Il-proprjetajiet ta' konteniment tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandhom jipprevjenu l-passaġġ tas-sustanza kimika tat-test madwar it-tarf tat-tessut vijabbli, li jista' jwassal għal mudellar ħażin tal-esponiment korneali. Iċ-ċelloli derivati mill-bniedem użati biex tiġi stabbilita l-binja ta' tessuti tal-RhCE għandhom ikunu ħielsa minn kontaminazzjoni b'batterji, b'vajrusis, b'mikoplażma, u b'fungi. L-isterilità tal-binja tat-tessuti għandha tiġi verifikata mill-fornitur għall-assenza ta' kontaminazzjoni b'fungi u b'batterji.

Kundizzjonijiet funzjonali

Vijabbiltà

26. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà tat-tessut hu l-assaġġ MTT (16). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhCE jnaqqsu l-MTT tal-kulurant vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). L-MTT formażan estratt jista' jiġi kwantifikat bl-użu ta' kejl tal-assorbanza standard (Densità Ottika (OD)) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (36). L-OD tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri OD < 0,1. L-utenti tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandhom jiżguraw li kull lott mill-binja tat-tessuti tal-RhCE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-VRMs jingħataw fit-Tabella 2. Utent tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat fir-rapport tat-test li t-tessuti ttrattati bis-sustanza tal-kontroll negattiv huma stabbli fil-koltura (jipprovdu kejl tal-vijabbiltà tat-tessuti simili) sakemm idum il-perjodu ta' esponiment tat-test. Il-produttur tat-tessuti għandu jsegwi proċedura simili bħala parti mir-rilaxx tal-lott tat-tessuti tal-kontroll tal-kwalità, iżda f'dan il-każ jistgħu

▼M8

jkunu japplikaw kriterji ta' aċċettazzjoni differenti minn dawk speċifikati fit-Tabella 2. Medda ta' aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-QC) għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE.

Tabella 2

Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (għall-utenti tat-test)

Test	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (kemm għall-protokolli tal-likwidi kif ukoll tas-solidi)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (kemm għall-protokolli tal-likwidi kif ukoll tas-solidi)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Dan il-limitu ta' aċċettazzjoni jqis il-possibbiltà li jiġi estiż iż-żmien tat-trasport għall-konsenja/tal-ħżin (eż. > erbat ijiem), li ntwera li ma jħallix impatt fuq il-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar (37).

Funzjoni ta' protezzjoni

27. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tkun folta u robusta biżżejjed biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi ta' referenza ċitotossiċi, kif stmati, eż., minn ET_{50} (Triton X-100) jew minn IC_{50} (SDS) (Tabella 3). Il-funzjoni ta' protezzjoni ta' kull lott tal-binja tat-tessuti tal-RhCE użat għandha tintwera mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-binja tat-tessuti tal-RhCE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 30).

Morfoloġija

28. L-eżaminazzjoni istoloġika tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha turi l-istruttura tal-epitelju li tixbah il-kornea umana (inklużi tal-anqas tliet saffi ta' ċelloli epiteljali vijabbli u superfiċje mhux keratinizzata). Għall-VRMs, il-morfoloġija xierqa ġiet stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur u għalhekk ma għandhiex bżonn terġa' tintwera minn utent ta' metodu ta' ttestjar għal kull lott tat-tessut użat.

Riproduċibbiltà

29. Ir-riżultati tal-kontrolli pożittivi u negattivi tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà maż-żmien.

Kontroll tal-kwalità (QC – Quality Control)

30. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-binja tat-tessuti tal-RhCE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-vijabbiltà (paragrafu 26) u l-funzjoni ta' protezzjoni (paragrafu 27) huma l-aktar rilevanti. Medda ta' aċċettabbiltà (limiti superjuri u inferjuri) għall-funzjonijiet ta' protezzjoni kif imkejla mill-EC_{50} jew mill-IC_{50} (ara l-paragrafi 25 u 26) għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Il-medda ta' aċċettabbiltà tal-ET_{50} u tal-IC_{50} użata bħala kriterju għar-rilaxx tal-lottijiet tal-QC mill-iżviluppatur/fornitur tal-binjiet tat-tessuti tal-RhCE (użati fil-VRMs) hi mogħtija fit-Tabella 3. Id-*data* li turi konformità mal-kriterji kollha tar-rilaxx tal-produzzjoni għandha tiġi pprovduta mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar biex dawn ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Huma biss riżultati prodotti b'tessuti li jissodisfaw dawn il-kriterji ta' rilaxx tal-produzzjoni kollha li jistgħu jiġu aċċettati għat-tbassir affidabbli ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU/is-CLP.

▼M8

Tabella 3

Kriterju tar-rilaxx tal-lottijiet tal-QC

Test	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (trattament ta' 30 b'50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u tal-Kontroll

31. Tal-anqas għandhom jintużaw żewġ repliki tat-tessuti għal kull sustanza kimika tat-test u għal kull sustanza tal-kontroll f'kull sessjoni. Jintużaw żewġ protokolli differenti tat-trattament, wieħed għal sustanzi kimiċi tat-test likwidi u wieħed għal sustanzi kimiċi tat-test solidi (34)(35). Kemm għall-metodi kif ukoll għall-protokolli, is-superfiċje tal-binja tat-tessuti għandha tiġi mxarrba b'Salina Baferjata tal-Fosfat ta' Dulbecco ħielsa minn kalċju u manjeżju (DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}) qabel l-applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test, biex jiġu imitati l-kundizzjonijiet imxarrba tal-għajn umana. It-trattament tat-tessuti titnieda bl-esponiment għas-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u għas-sustanzi tal-kontroll. Għaż-żewġ protokolli tat-trattament fiż-żewġ VRMs, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti tas-sustanza kimika tat-test jew tas-sustanza tal-kontroll biex tinkwesa b'mod uniformi s-superfiċje epiteljali filwaqt li tiġi evitata doża infinita (ara l-paragrafi 32 u 33) (Appendiċi 2).

32. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jistgħu jiġu pipettati f'temperatura ta' 37 °C jew f'temperaturi inferjuri (bl-użu ta' pipetta bi spostament pożittiv, jekk meħtieġa) jiġu trattati bħala likwidi fil-VRMs, inkella dawn għandhom jiġu trattati bħala solidi (ara l-paragrafu 33). Fil-VRMs, is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jitferrxu b'mod ugwali fuq is-superfiċje tat-tessut (jiġifieri applikazzjoni minima ta' 60 µl/cm^2) (ara l-Appendiċi 2, (33)(34)). Effetti kapillari (effetti ta' tensjoattivi) li jistgħu jseħħu minħabba l-volumi baxxi applikati għall-inserzjoni (fuq is-superfiċje tat-tessuti) għandhom jiġu evitati sa fejn possibbli biex jiġi garantit id-dożaġġ korrett tat-tessut. Tessuti trattati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test jiġu inkubati għal 30 min f'kundizzjonijiet standard tal-koltura (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika likwida tat-test u s-sustanzi tal-kontroll għandhom jitneħħew bil-galbu mis-superfiċje tat-tessuti bi tlaħliħ estensiv b'DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} f'temperatura ambjentali. Dan l-istadju ta' tlaħliħ jiġi segwit minn tgħaddis ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'temperatura ambjentali (biex titneħħa kwalunkwe sustanza kimika tat-test assorbita fit-tessut) għal perjodu predefinit ta' żmien li jvarja skont il-VRM użat. Għall-VRM1 biss, inkubazzjoni ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'kundizzjonijiet tal-koltura standard tiġi applikata qabel it-twettiq tal-assaġġ MTT (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)).

33. Is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jistgħux jiġu pipettati f'temperaturi sa 37 °C jiġu trattati bħala solidi fil-VRMs. L-ammont ta' sustanza kimika tat-test applikat għandu jkun suffiċjenti biex tiġi koperta s-superfiċje sħiħa tat-tessut, jiġifieri tal-anqas għandha tintuża applikazzjoni ta' 60 mg/cm^2 (Appendiċi 2). Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. Tessuti trattati b'sustanzi kimiċi solidi tat-test jiġu inkubati għal perjodu ta' żmien predefinit (skont il-VRM użat) f'kundizzjonijiet tal-koltura standard (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)). Fi tmiem il-perjodu ta'

▼M8

esponiment, is-sustanza kimika solida tat-test u s-sustanzi tal-kontroll għandhom jitneħħew bil-galbu mis-superfiċje tat-tessuti bi tlaħliħ estensiv b'DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} f'temperatura ambjentali. Dan l-istadju ta' tlaħliħ jiġi segwit minn tgħaddis ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'temperatura ambjentali (biex titneħħa kwalunkwe sustanza kimika tat-test assorbita fit-tessut) għal perjodu predefinit ta' żmien li jvarja skont il-VRM użat, u inkubazzjoni ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'kundizzjonijiet tal-koltura standard, qabel ma jitwettaq l-assaġġ tal-MTT (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)).

34. Għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi u pożittivi konkorrenti f'kull sessjoni biex jintwera li l-vijabbiltà (determinata bil-kontroll negattiv) u s-sensittività (determinata bil-kontroll pożittiv) tat-tessuti huma fi ħdan meded ta' aċċettazzjoni definiti fuq il-bażi ta' *data* storika. Il-kontroll negattiv konkorrenti jipprovdi wkoll il-linja bażi (vijabbiltà tat-tessuti ta' 100 %) bie tiġi kkalkolata l-vijabbiltà perċentwali relattiva tat-tessuti trattati bis-sustanza kimika tat-test (%$Viability_{test}$). Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv rakkomandata biex tintuża bil-VRMs hi l-aċetat tal-metil nadif (Nru tas-CAS 79-20-9, kummerċjalment disponibbli mingħand eż. Sigma-Aldrich, Kat# 45997; likwidu). Is-sustanzi tal-kontroll negattiv rakkomandati biex jintużaw bil-VRM1 u bil-VRM2 huma H_2O ultrapur u DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}, rispettivament. Dawn kienu s-sustanzi tal-kontroll użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-VRMs u huma dawk li għalihom teżisti l-aktar *data* storika. L-użu ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv jew negattiv alternattivi xierqa għandu jkun ġustifikat b'mod xjentifiku u adegwat. Il-kontrolli negattivi u pożittivi għandhom jiġu ttestjati bl-istess protokoll(i) bħal dak/dawk użat(i) għas-sustanzi kimiċi tat-test inklużi fis-sessjoni (jiġifieri għal-likwidi u/jew għas-solidi). Din l-applikazzjoni għandha tiġi segwita mill-esponiment għat-trattament, mit-tlaħliħ, minn tgħaddis ta' wara l-esponiment, u minn inkubazzjoni ta' wara l-esponiment fejn applikabbli, kif deskritti għall-kontrolli mwettqa b'mod konkorrenti għas-sustanzi kimiċi likwidi tat-test (ara l-paragrafu 32) jew għal kontrolli mwettqa b'mod konkorrenti fuq sustanzi kimiċi solidi tat-test (ara l-paragrafu 33), qabel it-twettiq tal-assaġġ tal-MTT (ara l-paragrafu 35) (34)(35). Sett wieħed biss ta' kontrolli negattivi u pożittivi hu biżżejjed għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha tal-istess stat fiżiku (likwidi jew solidi) inklużi fl-istess sessjoni.

Kejl tal-Vijabbiltà tat-Tessuti

35. L-assaġġ tal-MTT hu metodu kwantitattiv standardizzat (16) li għandu jintuża biex ikejjel il-vijabbiltà tat-tessuti taħt dan il-metodu ta' ttestjar. Hu kompatibbli mal-użu f'bini ta' tessut tridimensjonali. L-assaġġ tal-MTT jitwettaq wara l-perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara l-esponiment. Fil-VRMs, il-kampjun tal-binja tat-tessuti tal-RhCE jitqiegħed f'soluzzjoni ta' 0,3 ml MTT f'1 mg/ml għal 180±15-il min f'kundizzjonijiet standard tal-koltura. L-MTT tal-kulurant vitali jiġi ridott fi preċipitat tal-formażan MTT blu biċ-ċelloli vijabbli tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Imbagħad, il-prodott tal-formażan MTT blu preċipitat jiġi estratt mit-tessut bl-użu ta' volum xieraq ta' isopropanol (jew ta' solvent simili) (34)(35). It-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test għandhom jiġu estratti mill-quċċata u mill-qiegħ tat-tessuti, filwaqt li t-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi solidi tat-test u b'likwidi kkuluriti għandhom jiġu estratti mill-qiegħ tat-tessut biss (biex tiġi minimizzata kwalunkwe kontaminazzjoni potenzjali tas-soluzzjoni ta' estrazzjoni tal-isopropanol bi kwalunkwe sustanza kimika tat-test li tista' tkun għadha fuq it-tessut). It-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test li ma jinqalgħux minnufih jistgħu jiġu estratti wkoll mill-qiegħ tat-tessut biss. Is-sustanzi tal-kontroll negattiv u pożittiv ittestjati b'mod konkorrenti għandhom jiġu trattati b'mod simili għas-sustanza kimika tat-test. Il-formażan MTT estratt jista' jiġi kwantifikat jew b'kejl tal-assorbanza standard (OD) f'570 nm bl-użu ta' filtru band pass ta' massimu ta' ±30 nm jew bl-użu ta' proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafu 42) (11)(36).

▼**M8**

36. Il-proprjetajiet ottiċi tas-sustanza kimika tat-test jew l-azzjoni kimika ta' din fuq l-MTT jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-formażan MTT u dan jista' jwassal għal stima falza tal-vijabbiltà tat-tessut. Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-formażan MTT, jew bi tnaqqis dirett tal-MTT fi blu formażan MTT u/jew b'interferenza tal-kulur jekk is-sustanza kimika tat-test tassorbi, b'mod naturali jew minħabba l-proċeduri ta' trattament, fl-istess medda tal-OD bħall-formażan MTT (jiġifieri madwar 570 nm). Il-kontrolli minn qabel għandhom isiru qabel l-ittestjar biex ikunu jistgħu jiġu identifikati r-riduċenti potenzjali diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-kulur u għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex tiġi identifikata u kkoreġuta interferenza potenzjali mit-tali sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafi 37-41). Dan hu partikolarment importanti meta sustanza kimika speċifika tat-test ma titneħħiex għalkollox mill-binja tat-tessuti tal-RhCE bit-tlaħliħ jew meta din tippenetra l-epitelju li jixbah il-kornea u għalhekk tkun preżenti fil-binjiet tat-tessuti tal-RhCE meta jitwettaq l-assaġġ tal-MTT. Għal sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħall-formażan MTT (b'mod naturali jew wara t-trattament), li mhumiex kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT minħabba interferenza qawwija wisq, jiġifieri assorbiment qawwi f'570±30 nm, tista' tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafi 41 u 42) (11)(36). Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu individwati u kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs tal-VRMs (34)(35). Flowcharts illustrattivi li jippprovdu gwida dwar kif tidentifika u timmaniġġja riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi interferenti tal-kulur għall-VRM1 u għall-VRM2 huma pprovduti wkoll fl-Appendiċijiet III u IV rispettivament.

37. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħall-formażan MTT (b'mod naturali jew wara t-trattament) u tittieħed deċiżjoni dwar il-ħtieġa ta' kontrolli addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiżdied mal-ilma u/jew mal-isopropanol u tiġi inkubata għal ħin xieraq f'temperatura ambjentali (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi biżżejjed dawl fil-medda ta' 570±20 nm għall-VRM1 (ara l-Appendiċi 3), jew jekk tinkiseb soluzzjoni kkulurita meta s-sustanza kimika tat-test titħallat mal-ilma għall-VRM 2 (ara l-Appendiċi 4), is-sustanza kimika tat-test tiġi preżunta li tinterferixxi mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT u għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-koloranti jew, inkella, għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 41 u 42 u l-Appendiċijiet III u IV)(34)(35). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test interferenti għandha tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli, li ssirilhom il-proċedura sħiħa ta' ttestjar iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku f'tessuti ħajjin (NSC_{living}) (34)(35). Il-kontroll tal-NSC_{living} irid jitwettaq fl-istess ħin bħall-ittestjar tas-sustanza kimika tat-test ikkulurita u, f'każ ta' ttestjar multiplu, irid jitwettaq kontroll indipendenti tal-NSC_{living} li għandu jsir b'kull test imwettaq (f'kull sessjoni) minħabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT (%$Viability_{test}$) nieqes il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC_{living}), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [%$Viability_{test}$] - [%NSC_{living}].

38. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tiżdied ma' soluzzjoni MTT preparata ġdida. Jiżdied ammont xieraq tas-sustanza kimika tat-test ma' soluzzjoni tal-MTT u t-taħlita tiġi inkubata

▼**M8**

għal madwar tliet sigħat f'kundizzjonijiet standard tal-koltura (ara l-Appendiċijiet III u IV)(34)(35). Jekk it-taħlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test (jew is-sospensjoni għal sustanzi kimiċi tat-test insolubbli) issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod dirett l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq il-binjiet tat-tessuti tal-RhCE mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali tħaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu u jżommu s-sustanza kimika tat-test b'mod simili bħal tessuti vijabbli. It-tessuti maqtula tal-VRM1 jitħejjew b'esponiment għal temperatura baxxa ("qtil bil-friża"). It-tessuti maqtula tal-VRM2 jitħejjew b'inkubazzjoni fit-tul (eż. tal-anqas 24±1 siegħa) f'ilma segwita minn ħżin f'temperatura baxxa ("maqtula bl-ilma"). Kull sustanza kimika tat-test li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula li ssirilhom il-proċedura sħiħa ta' ttestjar biex jiġi ġenerat kontroll ta' tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) (34)(35). Kontroll tal-NSMTT wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/-sessjonijiet indipendenti mwettqa. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għar-riduċent tal-MTT (%Viability$_{test}$) nieqes it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess riduttur tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSMTT), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [%Viability$_{test}$] - [%NSMTT].

39. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu kemm interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 37) kif ukoll tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 38) se jkunu jeħtieġu wkoll it-tielet sett ta' kontrolli meta jitwettaq il-kejl tal-assorbanza standard (OD), minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC$_{living}$ deskritti fil-paragrafi ta' qabel. Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti skuri li jassorbu dawl fil-medda ta' 570±30 nm (eż. blu, vjola, suwed) minħabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 38. Dan iġiegħel l-użu ta' kontrolli tal-NSMTT, b'mod predefinit, flimkien mal-kontrolli tal-NSC$_{living}$. Is-sustanzi kimiċi tat-test li għalihom jitwettqu kemm il-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC$_{living}$ jistgħu jiġu assorbiti u jinżammu kemm minn tessuti ħajjin kif ukoll minn dawk maqtula. Għalhekk, f'dan il-każ, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test,iżda anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mill-assorbiment u miż-żamma tas-sustanza kimika tat-test mit-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC$_{living}$ diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mill-assorbiment u miż-żamma tas-sustanza kimika tat-test mit-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSC$_{killed}$) (ara l-Appendiċijiet III u IV)(34)(35). F'dan il-kontroll addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula, li ssirilhom il-proċedura tal-ittestjar sħiħa iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC$_{killed}$ wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa, iżda għandu jsir fl-istess ħin mal-kontroll tal-NSMTT u bl-istess lott ta' tessuti. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test (%Viability$_{test}$) nieqes %NSMTT nieqes %NSC$_{living}$ biż-żieda tal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC$_{killed}$), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [%Viability$_{test}$] - [%NSMTT] - [%NSC$_{living}$] + [%NSC$_{killed}$].

▼M8

40. Hu importanti li jiġi nnotat li r-riduzzjoni mhux speċifika tal-MTT u l-interferenzi mhux speċifiċi tal-kulur jistgħu jiżdiedu meta l-OD (meta jsiru kejlijiet tal-assorbanza standard) tal-estratt tat-tessuti ogħla mill-medda ta' linearità tal-ispettrofotometru u li r-riduzzjoni mhux speċifika tal-MTT tista' wkoll iżżid l-erja tal-quċċata tal-formażan MTT (meta jsiru kejlijiet tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC) tal-estratt tat-tessut f'livell ogħla mill-medda ta' linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-bażi, hu importanti li kull laboratorju jiddetermina l-medda tal-linearità tal-OD/tal-erja tal-quċċata tal-ispettrofotometru tiegħu, eż., bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7), disponibbli kummerċjalment mingħand, eż. Sigma-Aldrich (Kat# M2003), qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji.

41. Il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu ta' spettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur, meta l-interferenza osservata mal-kejl tal-formażan MTT ma tkunx qawwija wisq (jiġifieri l-ODs tal-estratti tat-tessut miksuba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal riduzzjoni diretta tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi ħdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru). Minkejja dan, ir-riżultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew $\%NSC_{living} \geq 60$ % (VRM1, u VRM2 għall-protokoll tal-likwidi) jew 50 % (VRM2 għall-protokoll tas-solidi) tal-kontroll negattiv għandhom jittieħdu b'attenzjoni peress li dan hu l-limitu stabbilit użat fil-VRMs biex jiġu distinti s-sustanzi kimiċi klassifikati minn dawk mhux klassifikati (ara l-paragrafu 44). Madankollu, l-assorbanza standard (OD) ma tistax titkejjel meta l-interferenza mal-kejl tal-formażan MTT tkun qawwija wisq (jiġifieri twassal għal ODs mhux ikkoreġuti tal-estratti tat-tessut tat-test li jaqgħu barra mill-medda lineari tal-ispettrofotometru). Sustanzi kimiċi tat-test kuluriti jew sustanzi kimiċi tat-test li jieħdu l-kulur f'kuntatt mal-ilma jew mal-isopropanol li jinterferixxu b'wisq qawwa mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT xorta waħda jistgħu jiġu vvalutati bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-Appendiċijiet III u IV). Dan għaliex is-sistema tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (36). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC_{living} jew tal-NSC_{killed} qatt ma jkunu meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta waħda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas l-MTT b'mod dirett (wara l-proċedura deskritta fil-paragrafu 38). Il-kontrolli tal-NSMTT għandhom jintużaw ukoll bis-sustanzi kimiċi tat-test li jkollhom (intrinsiku jew li jidher meta jkunu fl-ilma) kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom ta' tnaqqis dirett tal-MTT kif deskritta fil-paragrafu 38. Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessut tiġi kkalkolata bħala: $\%Viability_{test}$ nieqes %NSMTT, kif deskritta fl-aħħar sentenza tal-paragrafu 38. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT jew riduċenti diretti tal-MT li jkunu interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal ODs (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-ogħla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma jistgħux jiġu vvalutati b'metodi ta' ttestjar tal-RhCE, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħħu f'sitwazzjonijiet rari ħafna biss.

42. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażan MTT (11)(36). Minħabba d-diversità tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, mhuwiex fattibbli li kull

▼M8

utent jistabbilixxi l-istess eżatt kundizzjonijiet tas-sistema. B'hekk, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' dawk deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bijoanalitiċi (36) (38). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 5. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 5, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażan MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Kriterji ta' Aċċettazzjoni

43. Għal kull sessjoni li tuża l-lottijiet tat-tessut tal-RhCE li ssodisfaw il-kontroll tal-kwalità (ara l-paragrafu 30), tessuti relatati mas-sustanza tal-kontroll negattiv għandhom jesibixxu OD li tirrifletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-konsenja, l-istadji tar-riċevuta u l-proċessi tal-protokolli kollha u ma għandhomx ikunu barra mil-limiti stabbiliti storikament deskritti fit-Tabella 2 (ara l-paragrafu 26). B'mod simili, tessuti trattati bis-sustanzi tal-kontroll pożittiv, jiġifieri l-aċetat tal-metil, għandhom juru vijabbiltà medja tat-tessut ta' < 50 % meta mqabbla mal-kontroll negattiv fil-FRM1 bi protokolli tal-likwidi jew tas-solidi, u ta' ≤ 30 % (protokoll tal-likwidi) jew ta' ≤ 20 % (protokoll tas-solidi) meta mqabbla mal-kontroll negattiv fil-VRM2, u b'hekk jirriflettu l-ħila tat-tessuti li jwieġbu għal sustanza kimika tat-test irritanti fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (34)(35). Il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll għandha taqa' fi ħdan il-limiti aċċettati (jiġifieri d-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 % jew id-devjazzjoni standard (SD) bejn tliet repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-18 %). Jekk il-kontroll negattiv jew il-kontroll pożittiv inkluż f'sessjoni jkun barra mill-meded aċċettati, is-sessjoni titqies "mhix kwalifikata" u għandha tiġi ripetuta. Jekk il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti ta' sustanza kimika tat-test tkun barra mill-medda aċċettata, it-test irid jitqies "mhux kwalifikat" u s-sustanza kimika tat-test għandha terġa' tiġi ttestjata.

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir

44. Il-valuri tal-OD/il-quċċata tal-erjas miksuba bl-estratti tat-tessut tar-repliki għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jintużaw biex tiġi kkalkolata l-vijabbiltà medja perċentwali tat-tessut (medja bejn ir-repliki tat-tessut) normalizzata għall-kontroll negattiv, li hi stabbilita għal 100 %. Il-valur ta' limitu perċentwali għall-vijabbiltà tat-tessut għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew għal ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP) hu mogħti fit-Tabella 4. B'hekk, ir-riżultati għandhom jiġu interpretati kif ġej:

— Is-sustanza kimika tat-test tiġi identifikata bħala li ma teħtieġx klassifikazzjoni u tikkettar (Ebda Kategorija) tal-GHS tan-NU/tas-CLP jekk il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment tkun aktar (>) mill-valur ta' limitu perċentwali stabbilit tal-vijabbiltà tat-tessut, kif muri fit-Tabella 4. F'dan il-każ, ma jkun meħtieġ ebda ttestjar ulterjuri f'metodi ta' ttestjar oħra.

▼M8

— Jekk il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment tkun anqas minn jew daqs (≤) il-valur ta' limitu perċentwali stabbilit tal-vijabbiltà tat-tessut, ma jkun jista' jsir ebda tbassir, kif muri fit-Tabella 4. F'dan il-każ, ittestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar oħra jkun meħtieġ minħabba li l-metodi ta' ttestjar tal-RhCE juru ċertu numru ta' riżultati tal-pożittivi foloz (ara l-paragrafi 14-15) u ma jistgħux jiddistingwu bejn il-Kategoriji 1 u 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP (ara l-paragrafu 17).

Tabella 4

Mudelli tat-Tbassir skont il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP

VRM	Ebda Kategorija	Ma tista' ssir ebda previżjoni
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (għaż-żewġ protokolli)	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 60 %	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (għall-protokoll tal-likwidi)	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 60 %	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (għall-protokoll tas-solidi)	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 50 %	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 50 %

45. Test wieħed magħmul minn tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti għandu jkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta r-riżultat ikun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessut ugwali għal 60±5 % (VRM1, u VRM2 għall-protokoll tal-likwidi) jew 50±5 % (VRM2 għall-protokoll tas-solidi), għandu jiġi kkunsidrat it-tieni test, kif ukoll it-tielet wieħed f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ testijiet.

46. Valuri ta' limitu perċentwali differenti tal-vijabbiltà tat-tessut li jiddistingwu s-sustanzi kimiċi tat-test klassifikati minn dawk mhux klassifikati jistgħu jiġu kkunsidrati għal tipi speċifiċi ta' taħlitiet, fejn xieraq u ġustifikabbli, biex tiżdied il-prestazzjoni ġenerali tal-metodu ta' ttestjar għal dawk it-tipi ta' taħlitiet (ara l-paragrafu 14). Is-sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu siewja għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' ħsara serja lill-għajnejn/ta' irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanzi kimiċi tat-test jew ta' klassi ta' prodotti mhux magħrufa, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv ta' tossiċità okulari ta' sustanza kimika klassifikata fi ħdan medda speċifika ta' risponsi pożittivi.

DATA U RAPPORTAR

Data

47. Id-*data* minn tessuti ta' repliki individwali f'sessjoni (eż. valuri tal-OD/erjas tal-quċċata tal-formażan MTT u d-*data* tal-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali kkalkolata għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli, u t-tbassir finali tal-metodu ta' ttestjar tal-RhCE) għandha tiġi rapportata f'forma tabulari għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża d-*data* minn testijiet ripetuti, kif xieraq. Barra minn hekk, għandha tiġi rapportata l-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessut u d-differenza fil-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti (jekk n=2 tessuti replikati) għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll individwali. Kwalunkwe interferenza osservata ta' sustanza kimika tat-test mal-kejl tal-formażan MTT permezz tat-tnaqqis dirett tal-MTT u/jew tal-interferenza kkulurita għandha tiġi rapportata għal kull sustanza kimika ttestjata.

Rapport tat-Test

48. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼**M8**

Sustanza Kimika tat-Test

Sustanza monokostitwenti

— L-identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-reġistru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;

— L-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, il-LogP, il-piż molekulari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, *eċċ.*;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż. tisħin, ħin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita

— Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli skont, pereżempju, l-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn disponibbli;

— L-istat fiżiku u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

Sustanzi tal-Kontroll Pożittiv u Negattiv

— L-identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-reġistru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;

— L-istat fiżiku, il-volatilità, il-piż molekolari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-użu ta' kontroll negattiv differenti li mhuwiex H20 ultrapur jew DPBS ħielsa minn Ca 2+/Mg2+, jekk applikabbli;

— Ġustifikazzjoni għall-użu ta' kontroll pożittiv differenti li mhuwiex aċetat tal-metil nadif, jekk applikabbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni.

Informazzjoni dwar l-Isponser u l-Faċilità tat-Test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju.

— *Il-Binja tat-Tessuti tal-RhCE u l-Protokoll Użati (filwaqt li tiġi pprovduta r-raġuni għall-għażliet, jekk applikabbli)*

▼**M8**

Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar

— Il-binja tat-tessuti tal-RhCE użata, inkluż in-numru tal-lott;

— It-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl (eż. spettrofotometru);

— Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT;

— Deskrizzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC użata, jekk applikabbli;

— Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-binja tat-tessuti tal-RhCE speċifika użata inkluża l-prestazzjoni tagħha. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:

i) Il-kontroll tal-kwalità tal-vijabbiltà (fornitur)

ii) Il-vijabbiltà fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (utent);

iii) Il-kontroll tal-kwalità tal-funzjoni ta' protezzjoni;

iv) Il-morfoloġija, jekk disponibbli;

v) Ir-riproduċibbiltà u l-kapaċità ta' tbassir;

vi) Kontrolli oħra tal-kwalità (QC) tal-binja tat-tessuti tal-RhCE, jekk disponibbli;

— Referenza għad-*data* storika tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal: Aċċettabbiltà tad-*data* dwar il-QC b'referenza għad-*data* storika tal-lott;

— Dikjarazzjoni li l-faċilità ta' ttestjar uriet profiċjenza fl-użu tal-metodu ta' ttestjar qabel l-użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza;

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test

— Il-medji tal-kontrolli pożittivi u negattivi u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika;

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test;

Proċedura tat-Test

— Id-ettalji tal-proċedura tat-test użata,

— Id-ożi tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll użati;

— Id-urata u temperatura tal-perjodi ta' esponiment, tat-tgħaddis ta' wara l-esponiment u tal-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment (fejn applikabbli);

— Id-eskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika fil-proċedura tat-test;

▼**M8**

— L-indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur, jekk applikabbli;

— In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (kontroll pożittiv, kontroll negattiv, NSMTT, NSCliving u NSCkilled, jekk applikabbli);

Riżultati

— Tabultazzjoni tad-*data* minn sustanzi kimiċi tat-test u minn sustanzi tal-kontroll individwali, għal kull sessjoni (inklużi esperimenti ripetuti fejn applikabbli) u kull kejl tar-repliki, inklużi l-valur tal-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti, id-Differenza bejn ir-repliki tat-tessuti jew l-SD, u t-tbassir finali;

— Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti inklużi l-valur tal-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, %NSCliving, % NSCkilled, id-Differenza bejn ir-repliki tat-tessuti jew l-SD, il-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessut, u t-tbassir finali;

— Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bis-sustanzi tal-kontroll b'rabta mas-sessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati, eż. il-kolorazzjoni tat-tessuti minn sustanza kimika tat-test ikkulurita;

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) NU (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/Korrużjoni Akuta tal-Għajnejn.

(3) Il-Kapitolu B.47 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Opaċità u l-Permeabbiltà tal-Kornea fil-Bovini għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Ħsara Serja lill-Għajnejn.

(4) Il-Kapitolu B.48 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Għajnejn tat-Tiġieġ Iżolati għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni.

(5) Il-Kapitolu B.61 ta' dan l-Anness, Il-Metodu ta' Ttestjar tat-Tnixxija ta' Fluworexxina għall-Identifikazzjoni ta' Korrużivi Okulari u ta' Irritanti Severi.

▼**M8**

(6) Il-Kapitolu B.68 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar *In Vitro* b'Esponiment għal Ħin Qasir għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Ħsara Serja lill-Għajnejn.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Disponibbli fuq: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE u studju relatat ta' Cosmetics Europe dwar HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. Opinjoni tal-ESAC Nru 2014-03 tas-17 ta' Novembru 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697 Tħassir Disponibbli fuq: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Opinjoni tal-ESAC Nru 2016-02 tal-24 ta' Ġunju 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390 Tħassir Disponibbli fuq: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Il-Manuskritt Għadu Qed Jitħejja).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. Fi: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. F'*Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.u Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (5 ta' Marzu 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponibbli fuq: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (20 ta' Lulju 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponibbli fuq: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mejju 2001. Disponibbli fuq: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼M8

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' "rilevanza". Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (18).

Sustanza kimika ta' referenza: Sustanza kimika użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli għall-identifikazzjoni u għall-karatterizzazzjoni tagħhom; (ii) similarità strutturali, funzjonali u/jew tal-klassi tas-sustanza kimika jew tal-prodott għas-sustanza/i kimika/kimiċi li tkun/ikunu qed tiġi/jiġu ttestjata/i; (iii) il-karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) *data* ta' appoġġ dwar effetti magħrufa; u (v) il-potenza magħrufa fl-iskala tar-rispons mixtieq.

Approċċ Minn Isfel għal Fuq: Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li ma teħtieġx klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Konkordanza: Ara "Akkuratezza".

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-għajn li tiksi l-iris u l-pupilla u tħalli d-dawl jgħaddi għal ġol-parti interna tal-għajn.

CV: Koeffiċjent ta' Varjazzjoni.

Dev: Devjazzjoni.

EIT: Test tal-Irritazzjoni tal-Għajnejn.

EURL ECVAM: Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Annimali.

Irritazzjoni tal-għajnejn: Il-produzzjoni ta' tibdiliet fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ ta' wara tal-għajn, li jkunu kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti reversibbli fuq l-għajnejn" u mal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP".

ET_{50}: Ħin tal-esponiment meħtieġ biex il-vijabbiltà tat-tessuti titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni ta' sustanza kimika ta' riferiment f'konċentrazzjoni speċifikata fissa.

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon ta' sustanzi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' pożittivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

HCE: Epitelju Korneali Uman ta' SkinEthic™.

▼M8

HPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja.

IC_{50}: Konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % wara ħin ta' esponiment fis (eż. trattament ta' 30 minuta bl-SDS).

Doża infinita: Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-binja tat-tessuti tal-RhCE lil hinn mill-ammont meħtieġ biex tinkesa b'mod sħiħ u uniformi s-superfiċje tal-epiteljali.

Effetti irreversibbli fuq l-għajnejn: Ara "Ħsara serja lill-għajnejn".

LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni.

LogP: Logaritmu tal-koeffiċjent ta' partizzjoni tal-ottanol/ilma

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

MTT: Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

Kontroll negattiv: Kampjun li jkun fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li ma tinduċix rispons pożittiv fis-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn u jintuża biex tiġi determinata l-vijabbiltà tat-tessut ta' 100 %.

Mhux ikklassifikati: Sustanzi kimiċi li mhumiex klassifikati għall-Irritazzjoni tal-għajnejn (Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU) jew Ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP). Interkambjabbli ma' "Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP".

NSC_{killed}: Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

NSC_{living}: Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti ħajjin.

NSMTT: Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

OD: Densità Ottika.

Standards tal-prestazzjoni: Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat li tqies xjentifikament validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi: (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (18).

▼**M8**

Kontroll pożittiv: Kampjun li jkun fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tinduċi rispons pożittiv fis-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (18).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (18).

Test ta' sostituzzjoni: Test li hu mfassal biex jieħu post test li hu f'użu ta' rutina u aċċettat għall-identifikazzjoni tal-perikli u/jew għall-valutazzjoni tar-riskji, u li ġie determinat li jipprovdi protezzjoni ekwivalenti jew imtejba tas-saħħa tal-bniedem jew tal-annimali jew tal-ambjent, skont kif ikun applikabbli, meta mqabbel mat-test aċċettat, għas-sitwazzjonijiet u għas-sustanzi kimiċi ta' ttestjar possibbli kollha (18).

Riproduċibbiltà: Il-qbil bejn ir-riżultati miksub mill-ittestjar ripetut tal-istess sustanza kimika tat-test bl-użu tal-istess protokoll tat-test (Ara "Affidabbiltà") (18).

Effetti reversibbli fuq l-għajnejn: Ara "Irritazzjoni tal-għajnejn".

RhCE: Epitelju bħall-Kornea Umana Rikostitwit.

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll pożittiv.

SD: Devjazzjoni Standard.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (18).

▼M8

Ħsara serja lill-għajnejn: Il-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-għajnejn, jew ta' tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunux riversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti irreversibbli fuq l-għajn" u mal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP".

Proċeduri Operattivi Standard (SOP): Proċeduri formali miktuba li jiddeskrivu fid-dettall kif għandhom jitwettqu operazzjonijiet speċifiċi ta' rutina, u speċifiċi għat-testijiet, tal-laboratorju. Dawn huma meħtieġa mill-GLP.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (18).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Test: Sustanza kimika tat-test waħda testjata b'mod konkorrenti f'minimu ta' żewġ repliki ta' tessuti kif definiti fl-SOP korrispondenti.

Vijabbiltà tat-tessuti: Il-parametru li jkejjel l-attività sħiħa tal-popolazzjoni ċellulari f'tessut rikostitwit bħala l-ħila tagħha li tnaqqas l-MTT tal-kolorant vitali, li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, jikkorrispondi għall-għadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

Approċċ Minn Fuq Għal Isfel: Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika suspettata li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħra (eżitu negattiv).

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali: Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali, li tuża l-metodi ta' ttestjar f'sekwenza. L-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi rieżaminata, f'kull saff, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell biex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss fl-istrateġija. Jekk il-potenzjal/potenza ta' periklu ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti f'saff partikolari, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor (18).

ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP: Ara "Ħsara serja lill-għajnejn".

Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP: Ara "Irritazzjoni tal-għajnejn".

Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP: Sustanzi kimiċi li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni bħala tal-Kategorija 1 jew 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (jew tal-Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU). Interkambjabbli ma' "Mhux Klassifikati".

UPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Ħafna.

▼**M8**

UVCB: sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Metodu ta' ttestjar validu: Metodu ta' ttestjar meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Metodu ta' ttestjar qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (18).

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex jiġu determinati r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabli għall-għan propost (18).

VRM: Metodu ta' Riferiment Validat.

VRM1: EpiOcular™ EIT jissejjaħ il-Metodu ta' Riferiment Validat 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT jissejjaħ il-Metodu ta' Riferiment Validat 2.

Piż tal-evidenza: Il-proċess ta' kunsiderazzjoni tal-aspetti pożittivi u negattivi ta' diversi biċċiet ta' informazzjoni biex tinħareġ u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' periklu ta' sustanza kimika.

▼M8

Appendiċi 2

KOMPONENTI EWLENIN TAT-TEST GĦAT-TESTIJIET TAL-RHCE VALIDATI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI U TIKKETTAR GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW GĦAL ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokolli	Likwidi (pipettabbli f'37±1°C jew f'temperaturi anqas għal 15-il min)	Solidi (mhux pipettabbli)	Likwidi u viskuża (pipettabbli)	Solidi (mhux pipettabbli)
Superfiċje tal-mudell	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Numru ta' repliki tat-tessuti	Tal-anqas 2	Tal-anqas 2	Tal-anqas 2	Tal-anqas 2
Kontroll ta' qabel għall-interferenza tal-kulur	50 µl + 1 ml H_2O għal 60 min f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (sustanzi kimiċi tat-test mhux ikkuluriti), jew 50 µl + 2 ml isopropanol imħallat għal 2-3h f'RT ((sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti) → jekk l-OD tas-sustanza kimika tat-test f'570 ± 20 nm, wara t-tnaqqis tal-OD għall-isopropanol jew għall-ilma tkun > 0,08 (li tikkorrispondi għal madwar 5 % tal-OD medja tal-kontroll negattiv), għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin.	50 mg + 1 ml H_2O għal 60 min f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (sustanzi kimiċi tat-test mhux ikkuluriti) u/jew 50 mg + 2 ml isopropanol imħallat għal 2-3h f'RT (sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti u mhux ikkuluriti) → jekk l-OD tas-sustanza kimika tat-test f'570 ± 20 nm wara t-tnaqqis tal-OD għall-isopropanol jew għall-ilma tkun > 0,08 (li tikkorrispondi għal madwar 5 % tal-OD medja tal-kontroll negattiv), għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin.	10 µl + 90 µl H_2O imħallta għal 30 ± 2 min f'Temperatura Ambjentali (RT, 18-28°C) → jekk is-sustanza kimika tat-test tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin	10 mg + 90 µl H_2O imħallta għal 30 ± 2 min f'RT → jekk is-sustanza kimika tat-test tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin

▼M8

Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kontroll ta' qabel għat-tnaqqis dirett tal-MTT	soluzzjoni ta' 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml għal 180 ± 15-il min f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża (bħala kontroll negattiv jintuża 50 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)	soluzzjoni ta' 50 mg+ 1 ml MTT 1 mg/ml għal 180 ± 15-il min f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża (bħala kontroll negattiv jintuża 50 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)	soluzzjoni ta' 30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml għal 180 ± 15-il min f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma (bħala kontroll negattiv jintuża 30 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)	30 mg + 300 µl MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 180 ± 15-il min f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma (bħala kontroll negattiv jintuża 30 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)
Qabel it-trattament	20 µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} għal 30 ± 2 min f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, protetta mid-dawl.	20 µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} għal 30 ± 2 min f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, protetta mid-dawl.	-	-
Dożi u applikazzjoni tat-trattament	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) bl-użu ta' għodda kalibrata (eż. mgħarfa livellata kalibrata biex iżżomm 50 mg klorur tas-sodju).	10 µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Għal viskuži, uża xibka tan-najlon	30 µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Ħin u temperatura tal-esponiment	30 min (± 2 min) f'medium tat-tkabbir f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	6 sigħat (± 0,25 h) f'medium tat-tkabbir f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) f'medium tat-tkabbir f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	4 sigħat (± 0,1 h) f'medium tat-tkabbir f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Tlaħliħ f'temperatura ambjentali	tliet darbiet f'100 ml DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}	tliet darbiet f'100 ml DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}
Tgħaddis ta' wara l-esponiment	12-il min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir	25 min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir	30 min (± 2 min) f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH f'medium tat-tkabbir	30 min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir

▼M8

Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Inkubazzjoni ta' wara l-esponiment	120 min (± 15-il min) f'medium tat-tkabbir f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	18-il siegħa (± 0,25 ta' siegħa) f'medium tat-tkabbir f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	ebda	18-il siegħa (± 0,5 ta' siegħa) f'medium tat-tkabbir f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Kontroll negattiv	50 µl H_2O Ittestjat b'mod konkorrenti	50 µl H_2O Ittestjat b'mod konkorrenti	30 ± 2µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} Ittestjat b'mod konkorrenti	30 ± 2µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} Ittestjat b'mod konkorrenti
Kontroll pożittiv	50 µl Aċetat tal-metil Ittestjat b'mod konkorrenti	50 µl Aċetat tal-metil Ittestjat b'mod konkorrenti	30 ± 2µl Aċetat tal-metil Ittestjat b'mod konkorrenti	30 ± 2µl Aċetat tal-metil Ittestjat b'mod konkorrenti
Soluzzjoni MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Ħin u temperatura tal-esponiment	180 min (± 15-il min) f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15-il min) f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15-il min) f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15-il min) f'37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Solvent ta' estrazzjoni	2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni b'perforazzjoni tat-tessut)	2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-qiegħ tal-inserzjoni b'perforazzjoni tat-tessut)	1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)	1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-qiegħ tal-inserzjoni)
Ħin u temperatura tal-estrazzjoni	2-3 h bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT jew matul il-lejl f'4-10°C	2-3 h bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT jew matul il-lejl f'4-10°C	4 h bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT jew tal-anqas matul il-lejl mingħajr tħawwid f'4-10°C	Tal-anqas sagħtejn (2 h) bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT
Qari tal-OD	570 nm (550 - 590 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	570 nm (550-590 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	570 nm (540 - 600 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	570 nm (540 - 600 nm) mingħajr filtru ta' riferiment
Kontroll tal-Kwalità tat-Tessuti	Trattament b'100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Trattament b'100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Trattament ta' 30 min b'SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Trattament ta' 30 min b'SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

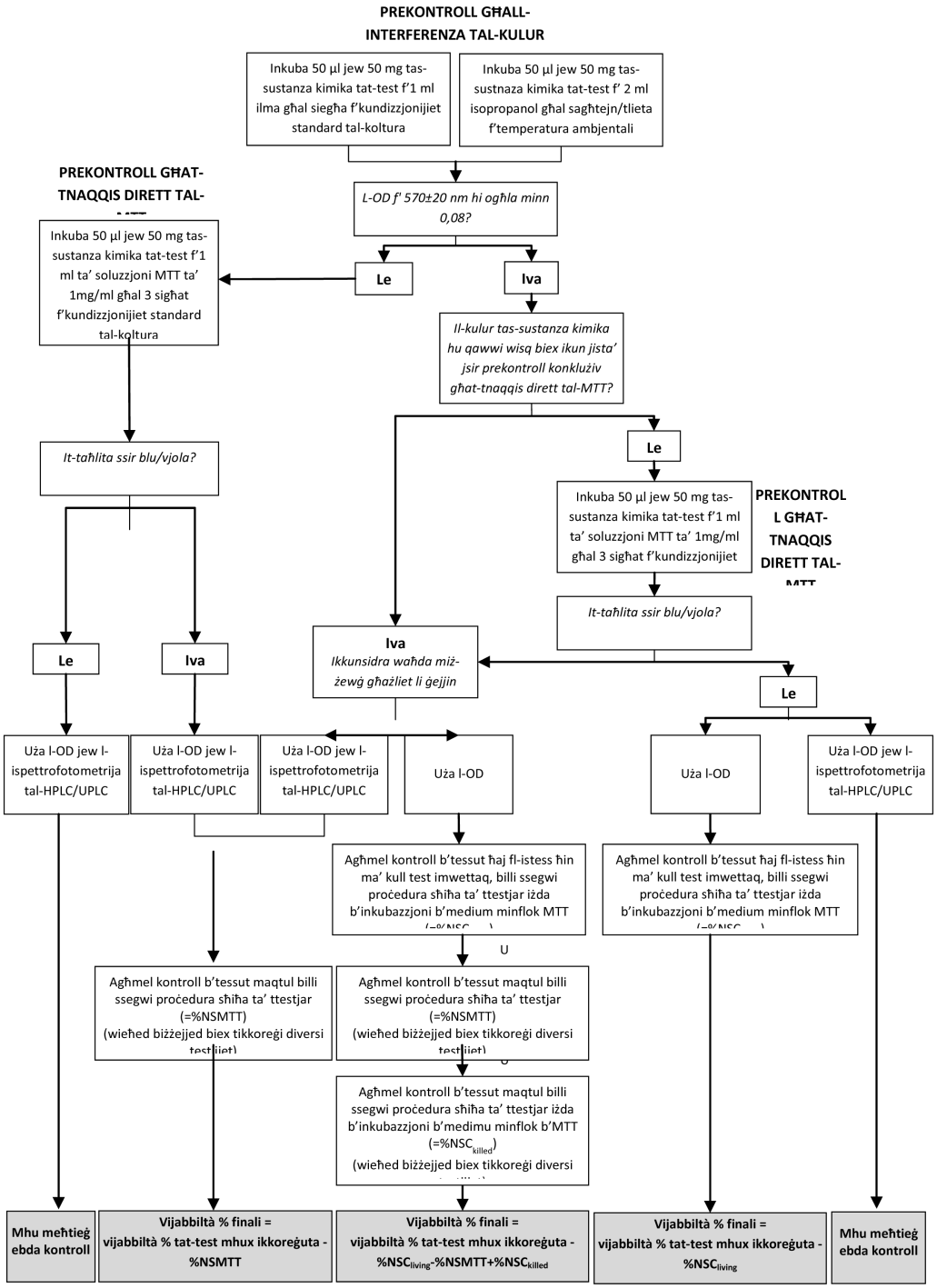
▼M8

Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kriterji tal-Aċċettazzjoni	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 0,8 u < 2,5 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 30 min bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 50 % 3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 0,8 u < 2,5 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 6 sigħat bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 50 % 3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 1,0 u ≤ 2,5 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 30 min bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun ≤ 30 % 3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 1,0 u ≤ 2,5 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 4 sigħat bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun ≤ 20 % 3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %.

▼**M8**

Appendiċi 3

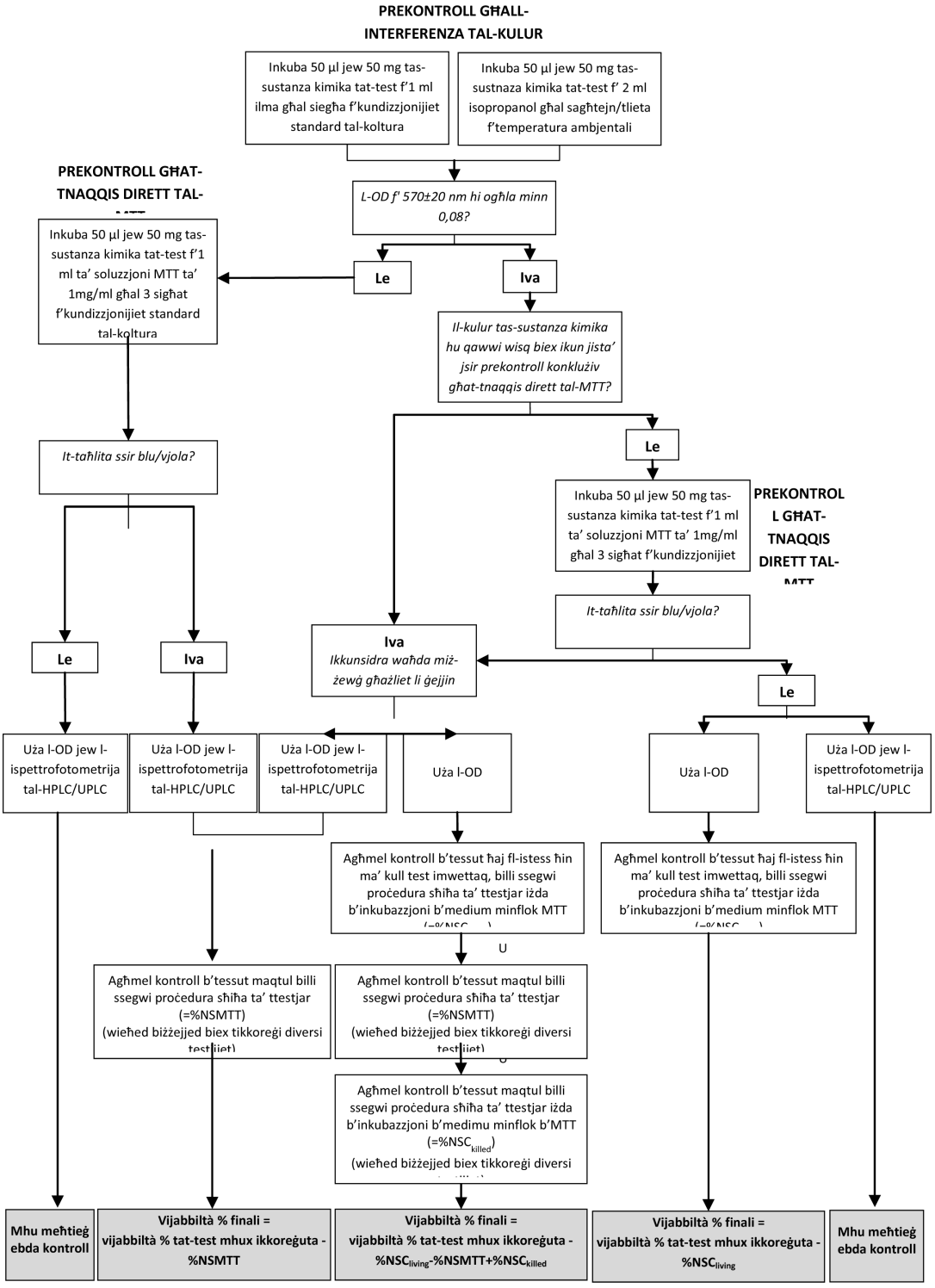
FLOWCHART ILLUSTRATTIVA LI TIPPROVDI GWIDA DWAR KIF TIDENTIFIKA U TIMMANIĠĠJA RIDUĊENTI DIRETTI TAL-MTT U/JEW SUSTANZI KIMIĊI INTERFERENTI TAL-KULUR, FUQ IL-BAŻI TAL-SOP TAL-VRM1



▼M8

Appendiċi 4

FLOWCHART ILLUSTRATTIVA LI TIPPROVDI GWIDA DWAR KIF TIDENTIFIKA U TIMMANIĠĠJA RIDUĊENTI DIRETTI TAL-MTT U/JEW SUSTANZI KIMIĊI INTERFERENTI TAL-KULUR, FUQ IL-BAŻI TAL-SOP TAL-VRM2



▼**M8**

Appendiċi 5

PARAMETRI EWLENIN U KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI GĦALL-KWALIFIKAZZJONI TA' SISTEMA TA' SPETTROFOTOMETRIJA TAL-HPLC/UPLC GĦALL-KEJL TAL-FORMAŻAN MTT ESTRATT MILL-BINJIET TAT-TESSUTI TAL-RHCE

Parametru	Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (36)(38)	Kriterji tal-Aċċettazzjoni
Selettività	Analiżi tal-isopropanol, inbjank ħaj (estratt tal-isopropanol minn binjiet tat-tessuti tal-RhCE ħajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn binjiet tat-tessuti tal-RhCE maqtula mingħajr ebda trattament), u ta' kolorant (eż. blu metilen)	$Area_{interference} \leq 20$ % ta' $Area_{LLOQ}$ ([1])
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità (jiġifieri formażan MTT f'1,6 µg/ml, 16 µg/ml u 160 µg/ml) fl-isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Effett tal-Matriċi	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=5)	85 % ≤ Effett tal-Matriċi % ≤ 115 %
Riport	Analiżi tal-isopropanol wara ULOQ ([2]) standard	$Area_{interference} \leq 20$ % tal-$Area_{LLOQ}$
Riproduċibbiltà (dakinhar)	3 kurvi tal-kalibrar indipendenti (fuq il-bażi ta' 6 dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekuttivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jiġifieri 200 µg/ml); Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	Kurvi ta' Kalibrazzjoni: % Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ Kontrolli tal-Kwalità: %Dev ≤ 15 % u CV ≤ 15 %
Riproduċibbiltà (bejn ġranet differenti)	Jum 1: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 2: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 3: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)	
Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhCE	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' ħżin f'temperatura ambjentali	%Dev ≤ 15 %
Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhCE, jekk meħtieġa	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' ħżin f'-20°C	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jiġifieri 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi (~70 µg/ml fil-VRM), jiġifieri 200 µg/ml.

▼M8

B.70 **ASSAĠĠI *IN VITRO* TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU RIKOMBINANTI UMAN (hrER) BIEX JIĠU INDIVIDWATI SUSTANZI KIMIĊI B'AFFINITÀ GĦALL-IRBIT TAL-ER**

INTRODUZZJONI ĠENERALI

Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni tal-OECD

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 493 tal-OECD (2015). It-TG 493 hi linja gwida tat-test ibbażata fuq il-prestazzjoni (PBTG), li tiddeskrivi l-metodoloġija għall-assaġġi *in vitro*-kombinanti umani biex jiġu individwati sustanzi b'affinità għall-irbit tar-riċettur tal-estroġenu (assaġġi tal-irbit tal-hrER). Din tinkludi żewġ assaġġi mekkanistikament u funzjonalment simili għall-identifikazzjoni tal-leganti tar-riċettur tal-estroġenu (jiġifieri ERα) u għandha tiffaċilita l-iżvilupp ta' assaġġi simili jew modifikati ġodda skont il-prinċipji għall-validazzjoni stabbiliti fl-OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). Il-metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ (l-Appendiċi 2 u l-Appendiċi 3) li jipprovdu l-bażi għal din il-PBTG huma:

— L-Assaġġ tal-Irbit tar-Riċettur tal-Estroġenu (ER) *In Vitro* ta' Freyberger-Wilson (FW) bl-Użu ta' ERα Rikombinanti Uman b'Tul Sħiħ (2), u

— L-Assaġġ tal-Irbit tar-Riċettur tal-Estroġenu *In Vitro* bl-Użu ta' Proteina tad-Dominju tal-Irbit tal-Ligand Rikombinanti tal-Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) (2).

L-istandards tal-prestazzjoni (PS) (3) huma disponibbli biex jiffaċilitaw l-iżvilupp u l-validazzjoni ta' metodi ta' ttestjar simili għall-istess punt ta' tmiem tal-periklu u jippermettu għall-emendar puntwali tal-PBTG 493 biex assaġġi simili ġodda jkunu jistgħu jiżdiedu ma' PBTG aġġornata. Madankollu, assaġġi ta' testijiet simili jiżdiedu biss wara rieżami u qbil mill-OECD li ntlaħqu l-istandards tal-prestazzjoni. L-assaġġi inklużi fit-TG 493 jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jiġu indirizzati r-rekwiżiti tal-pajjiżi membri tal-OECD għar-riżultati tat-testijiet dwar l-irbit tar-riċettur tal-estroġenu filwaqt li jinkiseb benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD.

Sfond u prinċipji tal-assaġġi inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar

2. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi l-linji gwida dwar it-testijiet eżistenti, u tiżviluppa linji gwida ġodda, għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali. Il-qafas kunċettwali (CF) tal-OECD għall-ittestjar u għall-valutazzjoni ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali ġie rivedut fl-2012. Is-CFs oriġinali u riveduti huma inklużi bħala Annessi fid-Dokument ta' Gwida dwar Linji Gwida tat-Testijiet Standardizzati għall-Evalwazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi għall-Interferenza Endokrinali (4). Is-CF jinkludi ħames livelli, b'kull livell li jikkorrispondi għal livell differenti ta' kumplessità bijoloġika. L-assaġġi tal-irbit tal-ER deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar huma l-livell 2, li jinkludi *"assaġġi in vitro li jipprovdu data dwar il-mekkaniżmu/i/il-perkors(i) endokrinali magħżula"*. Dan il-metodu ta' ttestjar hu għall-assaġġi tal-irbit tar-riċettur *in vitro* mfassla biex jidentifikaw ligandi għar-riċettur alfa tal-estroġenu uman (ERα).

▼M8

3. Ir-rilevanza tal-assaġġ tal-irbit tal-ER *in vitro* għall-funzjonijiet bijoloġiċi ntweriet biċ-ċar. L-assaġġi tal-irbit tal-ER huma mfassla biex jidentifikaw sustanzi kimiċi li għandhom il-potenzjal li jinterferixxu l-perkors tal-ormon estroġenu, u ntużaw b'mod estensiv matul l-aħħar żewġ deċennji għall-karatterizzazzjoni tad-distribuzzjoni tat-tessut tal-ER kif ukoll biex jiġu identifikati l-agonisti/antagonisti tal-ER. Dawn l-assaġġi jirriflettu l-interazzjoni ligand-riċettur li hi l-ewwel pass tal-perkors ta' senjalar tal-estroġenu u essenzjali għall-funzjoni ta' riproduzzjoni fil-vertebrati kollha.

4. L-interazzjoni tal-estroġeni mal-ERs tista' taffettwa t-traskrizzjoni tal-ġeni kkontrollati mill-estroġenu u jinduċu effetti mhux ġenomiċi, li tista' twassal għall-induzzjoni jew għall-inibizzjoni ta' proċessi ċellolari, inklużi dawk neċessarji għall-proliferazzjoni taċ-ċelloli, għall-iżvilupp normali tal-fetu, u għall-funzjoni riproduttiva (5) (6) (7). Il-perturbazzjoni ta' sistemi estroġeniċi normali jista' jkollha l-potenzjal li tiskatta effetti avversi fuq l-iżvilupp normali (ontoġenesi), is-saħħa riproduttiva u l-integrità tas-sistema riproduttiva. Senjalar mhux adatt tal-ER jista' jwassal għal effetti bħal riskju akbar ta' kanċer dipendenti fuq l-ormoni, fertilità indebolita, u alterazzjonijiet fit-tkabbir u fl-iżvilupp tal-fetu (8).

5. Assaġġi tal-irbit *in vitro* huma bbażati fuq interazzjoni diretta ta' sustanza ma' sit speċifiku ta' rbit tal-ligand tar-riċettur li jirregola t-traskrizzjoni tal-ġene. Il-komponent ewlieni tal-assaġġ tal-irbit tar-riċettur alfa tal-estroġenu rikombinanti uman (hrERα) ikejjel il-ħila ta' ligand radjotikkettat ([^{3}H]17β-estradjol) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu mal-ligand radjotikkettat f'konċentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawk is-sustanzi kimiċi b'affinità inferjuri għar-riċettur. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand u tiġi dokumentata l-ispeċifiċità tal-ER, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.

6. Studji ta' validazzjoni tas-CERI u l-assaġġi tal-irbit tal-FW urew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tagħhom għall-iskop maħsub tagħhom (2).

7. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

Ambitu u limitazzjonijiet relatati mal-assaġġi tal-irbit tar-riċettur

8. Dawn l-assaġġi qed jiġu proposti għall-finijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni, iżda jistgħu jipprovdu wkoll informazzjoni għal avveniment ta' inizjazzjoni molekolari (MIE) li tista' tintuża f'approċċ ta' piż tal-evidenza. Dawn jindirizzaw l-irbit kimiku mad-dominju tal-irbit tal-ligand tal-ERα f'sistema *in vitro*. B'hekk, ir-riżultati ma għandhomx jiġu estrapolati direttament għas-sinjalar u għar-regolamentazzjoni kumplessi tas-sistema endokrinali intatta *in vivo*.

▼**M8**

9. L-irbit tal-ligand naturali, 17β-estradjol, hu l-ewwel pass f'sensiela ta' avvenimenti molekulari li tattiva t-traskrizzjoni tal-ġeni fil-mira u, finalment, tintemm b'tibdil fiżjoloġiku (9). B'ħekk, l-irbit mad-dominju tal-irbit tal-ligand tal-ERα hu meqjus wieħed mill-mekkaniżmi ewlenin tal-interruzzjoni endokrinali (ED) medjata tal-ER, għalkemm hemm mekkaniżmi oħra li permezz tagħhom tista' sseħħ l-ED, inklużi (i) interazzjonijiet mas-siti tal-ERα li mhumiex iż-żona tal-irbit tal-ligand, (ii) interazzjonijiet ma' riċetturi oħra rilevanti għas-senjalar tal-estroġenu, riċettur tal-estroġenu akkoppjat tal-ERβ u tal-proteina-G, riċetturi oħra u sistemi enzimatiċi fi ħdan is-sistema endokrinali, (iii) sinteżi tal-ormoni, (iv) attivazzjoni metabolika u/jew inattivazzjoni tal-ormoni, (v) distribuzzjoni tal-ormoni biex jimmiraw lejn tessuti, u (vi) ikklerjar tal-ormoni mill-ġisem. L-ebda wieħed mill-assaġġi taħt dan il-metodu ta' ttestjar ma jindirizza dawn il-modalitajiet ta' azzjoni.

10. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-ħila tas-sustanzi li jorbtu mal-ERα umana u ma jagħmilx distinzjoni bejn agonisti jew antagonisti tal-ERα. Dawn l-assaġġi ma jindirizzawx avvenimenti downstream ulterjuri bħat-traskrizzjoni tal-ġeni jew tibdiliet fiżjoloġiċi. Peress li ntużaw sustanzi monokostitwenti singli biss matul il-validazzjoni, l-applikabbiltà għat-taħlitiet tat-test ma ġietx indirizzata. L-assaġġi xorta waħda huma teorikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti u taħlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

11. Is-sistemi ta' riċetturi ħielsa miċ-ċelloli ma għandhom ebda kapaċità metabolika intrinsika u ma ġewx validati flimkien mas-sistemi enzimatiċi metaboliċi. Madankollu, jista' jkun possibbli li attività metabolika tiġi inkorporata f'disinn ta' studju iżda dan ikun jeħtieġ sforzi ta' validazzjoni ulterjuri.

12. Sustanzi kimiċi li jistgħu jiddenaturaw il-proteina (jiġifieri proteina tar-riċettur), bħal tensjoattivi jew sustanzi kimiċi li jistgħu jbiddlu l-pH tal-bafer tal-assaġġ, ma jistgħux jiġu ttestjati jew jistgħu jiġu ttestjati biss f'konċentrazzjonijiet nieqsa minn interazzjonijiet bħal dawn. Inkella, il-medda ta' konċentrazzjonijiet li tista' tiġi ttestjata fl-assaġġi għal sustanza kimika tat-test hi limitata mis-solubbiltà ta' din fil-bafer tal-assaġġ.

13. Għal finijiet ta' informazzjoni, it-Tabella 1 tipprovdi r-riżultati tat-test għall-24 sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ assaġġi validati bis-sħiħ deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, 17 huma klassifikati bħala leganti tal-ER u 6 bħala mhux leganti fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġ tal-attivazzjoni traskrizzjonali tal-ER u/jew l-assaġġ uterotrofiku (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). B'referenza għad-*data* miġbura fil-qosor fit-Tabella 1, kien hemm qbil ta' kważi 100 % bejn iż-żewġ assaġġi dwar il-klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kollha sa 10^{-4}M, u kull sustanza ġiet klassifikata kif suppost bħala legant tal-ER jew mhux legant tal-ER. Informazzjoni supplimentari dwar dan il-grupp ta' sustanzi kif ukoll sustanzi addizzjonali ttestjati fl-assaġġi tal-irbit tal-ER matul l-istudji ta' validazzjoni hi pprovduta fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġ tal-irbit tal-hrER (3), fl-Appendiċi 2 (Tabelli 1, 2 u 3).

▼M8

Tabella 1

Klassifikazzjoni tas-sustanzi bħala leganti jew mhux leganti tal-ER meta ttestjati fl-Assaġġi tal-Irbit tal-hrER FW u CERI meta mqabbla mar-rispons mistenni

	Isem is-sustanza	CAS RN	Rispons Mistenni	Assaġġ FW		Assaġġ CERI		Sustanza Kimika MESH Klassi	Klassi tal-Prodott
				Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni	Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni		
1	17β-Estradjol	50-28-2	*Legant*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Legant	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
2	Noretinodrel	68-23-5	*Legant*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Legant	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Legant	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
3	Noretindron	68-22-4	*Legant*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Legant	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Legant	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
4	Ftalat tad-di-*n*-butil	84-74-2	*Mhux legant* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant (**) (+)	Idrokarbur (ċikliku), Ester	Plastifikant, Sustanza Intermedja
5	DES	56-53-1	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur (Ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
6	17α-etinilestradjol	57-63-6	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
7	Mmeso-Eżestrol	84-16-2	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur (Ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
8	Ġenisteina	446-72-0	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur (eteroċik-liku), Flavonojd	Prodott Naturali

▼M8

	Isem is-sustanza	CAS RN	Rispons Mistenni	Assaġġ FW		Assaġġ CERI		Sustanza Kimika MESH Klassi	Klassi tal-Prodott
				Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni	Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni		
9	Ekwol	531-95-3	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Metabolit tal-Fitoestroġenu	Prodott Naturali
10	Butil paraben (*n* butil-4-idrossibenżoat)	94-26-8	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Paraben	Preservattiv
11	Nonilfenol (taħlita)	84852-15-3	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Alkilfenol	Kompost Intermedju
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Organoklorur	Insettiċida
13	Kortikosteron	50-22-6	*Mhux legant* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux legant	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant	Sterojde	Prodott Naturali
14	Zearalenon	17924-92-4	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur (eteroċiklu), Latton	Prodott Naturali
15	Tamossifen	10540-29-1	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur, (Ċikliku)	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
16	5α-diidrotestosteron	521-18-6	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Sterojde, Nonfenoliku	Prodott Naturali
17	Bisfenol A	80-05-7	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Fenol	Intermedjarju Kimiku
18	4-*n*-ettilfenol	1987-50-4	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ekwivoku ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Alkilfenol	Intermedja

▼M8

	Isem is-sustanza	CAS RN	Rispons Mistenni	Assaġġ FW		Assaġġ CERI		Sustanza Kimika MESH Klassi	Klassi tal-Prodott
				Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni	Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni		
19	Kepon (Klordekon)	143-50-0	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur, (Aloġenat)	Pestiċida
20	Benż(a)antraċen	56-55-3	*Mhux Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Mhux Legant ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Mhux Legant ([b])	Idrokarbur Aromatiku	Intermedja
21	Enterolatton	78473-71-9	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Fitoestroġenu	Prodott Naturali
22	Proġesteron	57-83-0	*Mhux legant* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant	Sterojde	Prodott Naturali
23	Ottiltrietossisilan	2943-75-1	*Mhux legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Mhux Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Mhux Legant	Silan	Modifikatur tas-Superfiċje
24	Atrażina	1912-24-9	*Mhux legant* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant	Kompost eteroċikliku	Erbiċida

(*) Limitu tas-solubbiltà ta' $< 1 \times 10^{-4}$M.

(**) L-użu u l-klassifikazzjoni tal-ftalat tad-di-n-butil (DBP) bħala mhux legant kienu bbażati fuq l-ittestjar sa 10^{-4} M għaliex is-sustanza kienet ġiet osservata bħala insolubbli f'10^{-3}M (eż. turbiditá) f'xi laboratorji matul l-istudji ta' qabel il-validazzjoni.

(+) Matul l-istudju ta' validazzjoni, il-ftalat tad-di-*n*-butil (DBP) ġie ttestjat bħala sustanza tat-test kodifikata f'konċentrazzjonijiet sa 10^{-3}M. F'dawn il-kundizzjonijiet, ċerti laboratorji osservat tnaqqis fl-irbit radjoligand fl-ogħla konċentrazzjoni (10^{-3}M) u/jew dħul ta' kurva ambigwu. Għal dawn is-sessjonijiet, id-DBP ġie klassifikat bħala "ekwivoku" jew "legant" fi tlieta minn ħames laboratorji li użaw l-assaġġ CERI u f'ħamsa minn sitt laboratorji li użaw l-assaġġ FW (ara r-Referenza (2), Taqsimiet IV.B.3a,b u VI.A).

([a]) Il-klassifikazzjoni ma kinitx konsistenti mal-klassifikazzjoni mistennija. Klassifikazzjoni ta' 4-*n*-ettilfenol bħala "ekwivoku" jew "mhux legant" fi tlieta minn ħames laboratorji rriżultat fi klassifikazzjoni medja ta' ekwivoku. Spezzjoni aktar approfondita sabet li dan kien dovut għal limitazzjonijiet tas-solubbiltà kimika li pprevjenew il-produzzjoni ta' kurva tal-irbit sħiħa.

([b]) Matul l-istudju ta' validazzjoni, il-benż(a)antraċen ġie riklassifikat bħala mhux legant (jiġifieri negattiv) fuq il-bażi tad-dokumentazzjoni ippubblikata li wriet li l-attività estroġenika *in vitro* rapportata għal din is-sustanza (16) tiddependi primarjament mill-attivazzjoni metabolika tagħha (17)(18). L-attivazzjoni metabolika enzimatika tas-sustanza ma tkunx antiċipata f'assaġġi tal-irbit tal-hrER ħielsa miċ-ċelloli kif użati f'dan l-istudju ta' validazzjoni bejn il-laboratorji. B'hekk, il-klassifikazzjoni korretta għal din is-sustanza hi "mhux legant" meta tintuża fil-kundizzjonijiet sperimentali għall-assaġġi FW u CERI.

▼M8

KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER

Komponenti Essenzjali tal-Assaġġ

14. Dan il-metodu ta' ttestjar japplika għal assaġġi li jużaw riċettur tal-ER u ligand b'saħħtu biżżejjed għar-reċettur li jista' jintuża bħala markatur/traċċatur għall-assaġġ u jista' jiġi spostat b'konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. L-assaġġi leganti fihom iż-żewġ komponenti ewlenin li ġejjin: 1) irbit tas-saturazzjoni u 2) irbit kompetittiv. L-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni jintuża biex jiġu kkonfermati l-ispeċifiċità u l-attività tal-preparati tar-riċettur, filwaqt li l-esperiment tal-irbit kompetittiv jintuża biex tiġi evalwata l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li torbot mal-hrER.

Kontrolli

15. Il-bażi għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment konkorrenti proposti għandha tkun deskritta. Kontrolli konkorrenti (solvent (veikolu), pożittiv (legant tal-ER; affinità b'saħħitha u dgħajfa), negattiv (mhux legant)), kif xieraq, iservu bħala indikazzjoni li l-assaġġ hu operattiv skont il-kundizzjonijiet tat-test u jipprovdu bażi għal tqabbil bejn esperiment u ieħor; normalment dawn ikunu parti mill-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari (1). Kurvi sħaħ ta' konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dgħajjef u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom: 1) konċentrazzjoni għolja (bejn wieħed u ieħor spostament sħiħ ta' ligand radjotikkettat) u medja (madwar l-IC_{50}) ta' kull E2 u legant dgħajjef fit-triplikat; 2) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, kull wieħed fi triplikat.

Proċeduri Standard ta' Kontroll tal-Kwalità

16. Il-proċeduri standard ta' kontroll tal-kwalità għandhom isiru kif deskritt għal kull assaġġ biex jiġu żgurati riċetturi attivi, il-konċentrazzjonijiet kimiċi korretti, li l-limiti ta' tolleranza jibqgħu stabbli f'diversi repliki, u li tinżamm il-ħila li jiġu pprovduti r-risponsi mistennija ta' rbit tal-ER maż-żmien.

Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju

17. Qabel l-ittestjar ta' sustanza kimika mhux magħrufa bi kwalunkwe wieħed mill-assaġġi skont dan il-metodu ta' ttestjar, kull laboratojru għandu juri profiċjenza fl-użu tal-assaġġ billi jagħmel assaġġi tas-saturazzjoni biex jikkonferma l-ispeċifiċità u l-attività tal-preparazzjoni tal-ER, u l-assaġġi tal-irbit kompetittiv mal-estroġenu u mal-kontrolli ta' riferiment (legant dgħajjef u mhux legant). Bażi ta' *data* storika bir-riżultati għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment ġenerata minn bejn tlieta u ħames esperimenti indipendenti mwettqa f'jiem differenti għandha tkun stabbilita mil-laboratorju. Dawn l-esperimenti se jkunu l-bażi għall-estroġenu ta' riferiment u għall-kontrolli storiċi għal-laboratorju u se jintużaw bħala valutazzjoni parzjali tal-aċċettabbiltà tal-assaġġ għal sessjonijiet futuri.

18. Ir-risponsività tas-sistema tat-test tiġi kkonfermata wkoll bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 2. Il-lista ta' sustanzi ta' profiċjenza hi subsett tas-sustanzi ta' riferiment pprovduti fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġi tal-irbit tal-ER (3). Dawn is-sustanzi huma kummerċjalment disponibbli, jirrappreżentaw il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi assoċjati komunement mal-attività tal-irbit tal-ER, jesibixxu firxa xierqa ta' potenza mistennija għal-leganti tal-ER (jiġifieri b'saħħtu sa dgħajjef) u għal dawk mhux leganti (jiġifieri negattivi). Għal kull sustanza ta' profiċjenza, il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda pprovduta fit-Tabella 2. Għandhom isiru tal-anqas tliet esperimenti għal kull sustanza u r-riżultati għandhom ikunu konformi mal-attività kimika mistennija. Kull esperiment għandu jsir b'mod indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reaġent), bi tliet repliki għal kull konċentrazzjoni. Il-profiċjenza tintwera bil-klassifikazzjoni korretta (pożittiva/negattiva) ta' kull sustanza ta' profiċjenza. L-ittestjar tal-profiċjenza għandu jsir minn kull tekniku meta jkun qed jitgħallem l-assaġġi.

▼M8

Tabella 2

Lista ta' kontrolli u ta' sustanzi ta' profiċjenza għall-assaġġi tal-irbit kompetittiv tal-hrER (1)

Nru	Isem is-sustanza	RN tas-CAS (2)	Rispons Mistenni (3) (4)	Medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (M)	Klassi kimika tal-MeSH (5)	Klassi tal-prodott (6)
Kontrolli (Estroġenu ta' referenza, legant dgħajjef, mhux legant)						
1	17-εστραδφολ	50-28-2	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
2	Noretinodrel (jew) Noretindron	68-23-5 (jew) 68-22-4	Legant	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
3	Ottiltrietossisilan	2943-75-1	Mhux legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silan	Modifikatur tas-superfiċje
Sustanzi ta' profiċjenza (6)						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrokarbur (ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
5	17α-etinilestradjol	57-63-6	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
6	meso-Eżestrol	84-16-2	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrokarbur (ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
7	Tamossifen	10540-29-1	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrokarbur (ċikliku)	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
8	Ġenisteina	446-72-0	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kompost eteroċikliku, Flavonojd,	Prodott naturali
9	Bisfenol A	80-05-7	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenol	Intermedjarju kimiku
10	Żearalonon	17924-92-4	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Kompost eteroċikliku, Latton	Prodott Naturali

▼M8

Nru	Isem is-sustanza	RN tas-CAS (2)	Rispons Mistenni (3) (4)	Medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (M)	Klassi kimika tal-MeSH (5)	Klassi tal-prodott (6)
11	Butil paraben	94-26-8	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Aċidu karbossiliku, Fenol	Preservattiv
12	Atrażina	1912-24-9	Mhux legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kompost eteroċikliku	Erbiċida
13	Ftalat tad-di-n-butil (DBP) (7)	84-74-2	Mhux legant (8)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Idrokarbur (ċikliku), Ester	Plastifikant, Sustanza intermedja
14	Kortikosteron	50-22-6	Mhux legant	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Sterojde	Prodott naturali

(1) Jekk sustanza ta' profiċjenza ma għadhiex kummerċjalment disponibbli, tista' tintuża sustanza bl-istess klassifikazzjoni tal-irbit tal-ER, u b'potenza u bi klassi kimika komparabbli.
(2) Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi.
(3) Klassifikazzjoni bħala Legant jew Mhux Legant tal-ERαmatul l-istudju ta' validazzjoni għall-Assaġġi tal-Irbit tal-hrER CERI u FW (2).
(4) L-attività tal-irbit tal-ER kienet ibbażata fuq id-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbit tal-ER u AT (9) kif ukoll fuq *data* empirika u informazzjoni oħra miksuba minn studji ta' riferiment ppubblikati u rieżaminati (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bażi ta' *Data* tas-Sustanzi Perikoluži tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) Id-DBP jista' jintuża bħala mhux legant tal-kontroll alternattiv ittestjat b'konċentrazzjoni massima ta' 10^{-4} M.
(8) Il-limitu tas-solubbiltà għal din is-sustanza hu ta' 10^{-4} M. L-użu u l-klassifikazzjoni tal-ftalat tad-di-n-butil (DBP) bħala mhux legant kienu bbażati fuq l-ittestjar sa 10^{-4} M għaliex is-sustanza kienet ġiet osservata bħala insolubbli f'10^{-3}M (eż. turbidità) f'xi laboratorji matul l-istudji ta' qabel il-validazzjoni.

▼M8

L-ittestjar tas-Solubbiltà u s-Sejbien tal-Medda ta' Konċentrazzjonijiet għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

19. Għandu jsir test preliminari biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir it-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1 mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'kontroll b'solvent flimkien ma' tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdew bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà tas-Sessjoni tat-Test

20. Aċċettazzjoni jew rifjut ta' sessjoni tat-test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni tar-riżultati miksuba għall-estroġenu u għall-kontroll referenzjali użati għal kull esperiment. L-ewwel, għall-pjastra nru 1, il-kurvi sħaħ tal-konċentrazzjoni għall-kontrolli ta' riferiment minn kull esperiment għandhom jissodisfaw il-miżuri tal-prestazzjoni b'parametri tad-dħul ta' kurva (eż. IC_{50} u Hillslope) fuq il-bażi tar-riżultati rapportati għall-protokolli rispettivi għall-assaġġi CERI u FW (Appendiċi 2 u 3), u d-*data* storika tal-kontroll mil-laboratorju li jwettaq it-test. Il-kontrolli kollha (estroġenu ta' referenza, legant dgħajjef, u mhux legant) għandhom jiġu klassifikati kif suppost għal kull esperiment. It-tieni, il-kontrolli fuq il-pjastri sussegwenti kollha jridu jiġu vvalutati għall-konsistenza mal-pjastra nru 1. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċċata tal-kurva tal-irbit kompetittiv. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-tliet sessjonijiet indipendenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-ħila ta' twettiq tal-assaġġ b'konsistenza għandha tintwera bl-iżvilupp u biż-żamma ta' bażi ta' *data* storika għall-estroġenu u għall-kontrolli referenzjali. Id-devjazzjonijiet standard (SD) jew il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni (CV) għall-parametri ta' dħul tal-kurvi tal-estroġenu u tal-legant dgħajjef tal-kontroll referenzjali minn diversi esperimenti jistgħu jintużaw bħala kejl tar-riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju. Għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati tal-kontroll tal-pjastra minn kull sessjoni kif ukoll għal kull sustanza kimika tat-test.

Barra minn hekk, għandhom jiġu rispettati l-prinċipji li ġejjin rigward il-kriterji ta' aċċettazzjoni:

— Id-*data* għandha tkun suffiċjenti biex issir valutazzjoni kwantitattiva tal-irbit tal-ER

— Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom jibqgħu fi ħdan il-medda ta' solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test.

Analiżi tad-*data*

21. Il-proċedura definita ta' analiżi tad-*data* għas-saturazzjoni u d-*data* dwar l-irbit kompetittiv għandhom jaderixxu mal-prinċipji ewlenin għall-karatterizzazzjoni tal-interazzjonijiet riċettur-ligand. Tipikament, id-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni tiġi analizzata bl-użu ta' mudell ta' rigressjoni mhux lineari li jqis l-irbit totali u mhux speċifiku. Tista' tkun meħtieġa korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. Swillens, 1995 (19)) meta jiġu determinati l-Bmax u l-Kd. Id-*data* minn assaġġi tal-irbit kompetittiv tipikament tiġi trasformata (eż. irbit speċifiku perċentwali u konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test)

▼M8

(log M)). Stimi tal-log (IC_{50}) għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għaddħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri. Wara analiżi inizjali, għandhom isiru rieżami tal-parametri ta' dħul ta' kurva u rieżami viżwali ta' kemm id-*data* dwar l-irbit tidħol fil-kurva ta' rbit kompetittiv ġenerata. F'ċerti każijiet, tista' tkun meħtieġa analiżi addizzjonali biex jinkiseb l-aħjar dħul ta' kurva (eż. ristrezzjoni tal-quċċata u/jew tal-qiegħ tal-kurva, l-użu tar-regola tal-10 %, ara l-Appendiċi 4 u r-Referenza 2 (Taqsima III.A.2).

22. L-ilħuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà (paragrafu 20) jindika li s-sistema tal-assaġġ qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe test partikolari jipproduċi *data* preċiża. Ir-replikar tar-riżultati korretti tal-ewwel test hu l-aħjar indikazzjoni li tkun ġiet prodotta *data* preċiża.

Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data* Ġenerali

23. Bħalissa ma hemm ebda metodu miftiehem f'livell universali għall-interpretazzjoni tad-*data* dwar l-irbit tal-ER. Madankollu, kemm il-valutazzjonijiet kwalitattivi (eż. legant/mhux legant) u/jew kwantitattivi (eż. log IC_{50}, Affinità Relattiva għall-Irbit (RBA), eċċ.) tal-attività medjata bl-hrER għandhom ikunu bbażati fuq *data* empirika u ġudizzju xjentifiku solidu.

Rapport tat-Test

24. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Assaġġ:

— l-assaġġ użat;

Il-kontroll/Ir-riferiment/Is-sustanza kimika tat-test

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solvent/Veikolu:

— il-karatterizzazzjoni (natura, fornitur u lott);

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

▼**M8**

Riċetturi:

— is-sors tar-riċetturi (fornitur, Nru tal-katalogu, lott, speċi tar-riċettur, konċentrazzjoni attiva tar-riċettur ipprovduta mill-fornitur, ċertifikazzjoni mingħand il-fornitur)

— karatterizzazzjoni tar-riċetturi (inklużi r-riżultati tal-irbit tas-saturazzjoni): Kd, Bmax,

— ħżin tar-riċetturi

— ligand radjotikkettat:

— fornitur, Nru tal-katalogu., lott, attività speċifika

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— limitazzjonijiet tas-solubbiltà skont il-kundizzjonijiet tal-assaġġ;

— il-kompożizzjoni tal-bafer tal-irbit;

— il-konċentrazzjoni tar-riċettur;

— il-konċentrazzjoni tat-traċċatur (jiġifieri ligand radjotikkettat);

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— il-veikolu perċentwali fl-assaġġ finali;

— it-temperatura u l-ħin tal-inkubazzjoni;

— il-metodu tal-irbit/tas-separazzjoni libera;

— il-kontrolli pożittivi u negattivi/l-istandards referenzjarji;

— il-kriterji biex it-testijiet jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

Kontroll tal-aċċettabbiltà:

— il-valuri attwali tal-IC_{50} u tal-Hillslope għall-kontrolli pożittivi konkorrenti/għas-sustanzi referenzjali;

Ir-riżultati:

— *data* mhux proċessata u marbuta/libera;

— kontroll tal-konferma tad-denaturazzjoni, jekk xieraq;

— jekk teżisti, l-anqas konċentrazzjoni effettiva (LEC);

— il-valuri tal-RBA u/jew tal-IC_{50} kif xieraq;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— analiżijiet statistiċi, jekk jeżistu, flimkien ma' kejl tal-errur u tal-kunfidenza (eż. SEM, SD, CV jew CI ta' 95 %) u deskrizzjoni ta' kif inkisbu dawn il-valuri;

▼**M8**

Diskussjoni tar-riżultati:

— applikazzjoni tar-regola tal-10 %

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. u Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Ġappun. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Ittri, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Ittri, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼**M8**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET U ABBREVJAZZJONIJIET

Ir-Regola tal-10 %: L-għażla li mill-analiżijiet jiġu eskluży l-punti tad-*data* fejn il-medja tar-repliki għal-limitu speċifiku tal-[^{3}H]17β-estradjol tkun 10 % jew aktar minn dik osservata għall-valur medju f'konċentrazzjoni inferjuri (ara l-Appendiċi 4).

Kriterji ta' aċċettabbiltà: L-istandards minimi għat-twettiq tal-kontrolli sperimentali u l-istandards referenzjarji. Il-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha għandhom jiġu ssodisfati biex esperiment jitqies validu.

Akkuratezza (konkordanza): Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-assaġġ u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-assaġġ u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' assaġġ (1).

CF: Il-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Evalwazzjoni tal-Interferenti Endorkinali.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

CV: Koeffiċjent ta' varjazzjoni

E2: 17β-estradjol

ED: Interferenza endokrinali

hERα:: Riċettur alfa tal-estroġenu uman

ER: Riċettur tal-Estroġenu

Attività estroġenika: Il-kapaċità ta' sustanza kimika li timita 17β-estradjol fil-ħila tiegħu li jorbot riċetturi tal-estroġenu. L-irbit mal-hERα jista' jiġi individwat b'dan il-metodu ta' ttestjar.

IC 50: Il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test inibitorja.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl ta' kemm laboraotrji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi, jistgħu jipproduċu riżultati kwalitattivament u kwantitattivament simili. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hi determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm assaġġ jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (1).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jistgħu jirreplikaw b'suċċess ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku f'ħinijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll "riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju" (1).

LEC: L-anqas konċentrazzjoni effettiva hi l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tipproduċi rispons (jiġifieri l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha l-induzzjoni tad-drabi tkun statistikament differenti mill-kontroll b'veikolu konkorrenti).

▼M8

Test me-too: Espressjoni kollokwjali għal assaġġ li jkun strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat u aċċettat. Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili

PBTG: Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni

Standards tal-prestazzjoni: Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' assaġġ propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inklużi hemm (1) il-komponenti essenzjali tal-assaġġ; (2) lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (3) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-assaġġ validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (1).

Sustanzi ta' profiċjenza: Subsett tas-Sustanzi ta' riferiment inklużi fl-Istandards tal-Prestazzjoni li jistgħu jintużaw mil-laboratorji biex tintwera kompetenza teknika b'assaġġ standardizzat. Il-kriterji tal-għażla għal dawn is-sustanzi tipikament jinkludu li dawk jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi, ikunu kummerċjalment disponibbli, u jkollhom *data* ta' riferiment ta' kwalità għolja disponibbli.

Profiċjenza: Il-ħila murija biex jitwettaq assaġġ kif suppost qabel l-ittestjar ta' sustanza mhux magħrufa.

Estroġenu ta' riferiment: 17ß-estradjol (E2, CAS 50-28-2).

Metodi ta' ttestjar ta' riferiment: L-assaġġi li fuqhom hi bbażata PBTG 493.

RBA: Affinità Relattiva għall-Irbit. L-RBA ta' sustanza tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC_{50}) għas-sustanza relattiva għal-log (IC_{50}) għal 17β-estradjol

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni ta' assaġġ mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm l-assaġġ għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-preċiżjoni (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar) (1).

Affidabbiltà: Kejl ta' kemm assaġġ jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduttività ta' fost u bejn il-laboratorji.

SD: Devjazzjoni standard.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Metodu ta' ttestjar validat: Assaġġ li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex tiġi determinata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabli għall-għan propost (1).

Validazzjoni: Il-proċess li bih l-affidabbiltà u r-rilevanza ta' approċċ, ta' metodu, ta' assaġġ, ta' proċess jew ta' valutazzjoni partikolari jkunu stabbiliti għal għan definit (1).

▼**M8**

Appendiċi 2

L-ASSAĠĠI IN VITRO TAL-IRBIT TAS-SATURAZZJONI U KOMPETITTIV TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU (ERA) TA' FREYBERGER-WILSON BL-UŻU TAL-ERA RIKOMBINANTI B'TUL SĦIĦ

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. Dan l-assaġġ *in vitro* tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv tar-Riċettur tal-Estroġenu (ERα) juża r-riċettur uman b'tul sħiħ ERα(hrERα) li hu prodott f'ċelloli ta' insetti infettati bil-bakulovajrus u iżolat minnhom. Il-protokoll, żviluppat minn Freyberger u Wilson, għadda minn studju ta' validazzjoni multilaboratorju internazzjonali (2) li wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tiegħu għall-iskop maħsub tal-assaġġ.

2. Dan l-assaġġ hu proċedura ta' skrinjar għall-identifikazzjoni ta' sustanzi li jistgħu jorbtu mal-hrERα b'tul sħiħ. Jintuża biex jiddetermina l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tikkompeti ma' 17β-estradjol għall-irbit mal-hrERα. Ir-riżultati kwantitattivi tal-assaġġ jistgħu jinkludu l-IC_{50} (kejl tal-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test meħtieġa biex jiġi spostat nofs l-[^{3}H]-17β-estradjol mill-hrERα) u l-affinitajiet għall-irbit relattiv tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-hrERα meta mqabbel ma' 17β-estradjol. Għall-finijiet ta' skrinjar tas-sustanzi kimiċi, ir-riżultati kwalitattivi aċċettabbli tal-assaġġ jistgħu jinkludu klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test bħala leganti tal-hrERα, mhux leganti, jew ekwivoċi fuq il-bażi tal-kriterji deskritti għall-kurvi tal-irbit.

3. L-assaġġ juża ligand radjuattiv li jeħtieġ liċenzja tal-materjali radjuattivi għal-laboratorju. Il-proċeduri kollha b'radjoisotopi u b'sustanzi kimiċi perikoluż għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri deskritti mil-leġiżlazzjoni nazzjonali.

4. Għandhom jinqraw **INTRODUZZJONI ĠENERALI** u **KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER** qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJI TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. L-assaġġ tal-irbit tal-hrERα jkejjel il-ħila ta' ligand radjotikkettat ([3H]17β-estradjol) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu mal-ligand radjotikkettat f'konċentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawk is-sustanzi kimiċi b'affinità inferjuri għar-riċettur.

6. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.

7. L-iskop tal-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni hu li jikkaratterizza lott partikolari ta' riċetturi għall-affinità u n-numru tal-irbit bi tħejjija għall-esperiment tal-irbit kompetittiv. L-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni jkejjel, taħt kundizzjonijiet ta' ekwilibriju, l-affinità ta' konċentrazzjoni fissa tar-riċettur tal-estroġenu għal-ligand naturali tiegħu (rappreżentat mill-kostanti ta' dissoċjazzjoni, Kd), u l-konċentrazzjoni tas-siti attivi tar-riċettur (Bmax).

▼M8

8. L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-affinità ta' sustanza biex tikkompeti ma' [3H]17β-estradjol għall-irbit mal-ER. L-affinità hi kwantifikata mill-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li, f'ekwilibriju, tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku tal-[3H]17β-estradjol (imsejħa l-konċentrazzjoni inibitorja 50 % jew IC50). Din tista tiġi evalwata wkoll bl-użu tal-affinità relattiva għall-irbit (RBA, relattiva għall-IC50 tal-estradjol imkejla b'mod separat fl-istess sessjoni). L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' [3H]17β-estradjol f'konċentrazzjoni fissa fil-preżenza ta' firxa wiesgħa (tmien ordnijiet ta' kobor) tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad id-*data* tiddaħħal, fejn possibbli, biex tifforma l-ekwazzjoni ta' Hill (Hill, 1910) li tiddeskrivi l-ispostament tar-radjoligand minn legant kompetittiv ta' sit wieħed. Il-firxa tal-ispostament tal-estradjol radjotikkettat fl-ekwilibriju tintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi karatterizzata bħala legant, mhux legant, jew waħda li tiġġenera rispons ekwivoku.

PROĊEDURA

Wiri ta' Prestazzjoni Aċċettabbli tal-Proteina tal-hrERα

9. Qabel it-twettiq ta' rutina tal-assaġġi tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv, għandu jintwera li kull lott ġdid tal-hrERα jkollu prestazzjoni korretta fil-laboratorju fejn se jintuża. Għandu jintuża proċess imqassam fuq żewġ stadji biex tintwera l-prestazzjoni. Dawn l-istadji huma dawn li ġejjin:

— Agħmel assaġġ tal-irbit ta' [^{3}H]-17β-estradjol tas-saturazzjoni biex turi l-ispeċifiċità u s-saturazzjoni tal-hrERα. Analiżi ta' rigressjoni nonlineari ta' din id-*data* (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) u l-plott Scatchard sussegwenti għandha tiddokumenta l-affinità għall-irbit tal-hrERα ta' [^{3}H]-17β-estradjol (Kd) u n-numru ta' riċetturi (Bmax) għal kull lott tal-hrERα.

— Agħmel assaġġ tal-irbit kompetittiv billi tuża s-sustanzi tal-kontroll (estroġenu ta' riferiment (17β-estradjol)), legant dgħajjef (eż. noretinodrel jew noretindron), u mhux legant (ottiltrietossisilan, OTES). Kull laboratorju għandu jistabbilixxi bażi ta' *data* storika biex jiddokumenta l-konsistenza tal-IC_{50} u ta' valuri rilevanti oħra għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef fost l-esperimenti u l-lottijiet differenti tal-hrERα. Il-parametri tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għas-sustanzi tal-kontroll għandhom ikunu fi ħdan il-limiti tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (ara t-Tabella 1) li ġew żviluppati bl-użu tad-*data* mil-laboratorji li ħadu sehem fl-istudju ta' validazzjoni għal dan l-assaġġ (2).

Tabella 1

Kriterji tal-prestazzjoni żviluppati għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef, Assaġġ FW tal-Irbit tal-hrER.

Sustanza	Parametru	Medja ([a])	Devjazzjoni Standard X (n)	Intervall ta' Kunfidenza ta' 95 % ([b])	
				Limitu Inferjuri	Limitu Superjuri
17β-estradjol	Quċċata (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Qiegħ (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Pendil ta' Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼M8

Sustanza	Parametru	Medja [a]	Devjazzjoni Standard X (n)	Intervall ta' Kunfidenza ta' 95 % [b]	
				Limitu Inferjuri	Limitu Superjuri
Noretinodrel	Quċċata (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Qiegħ (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Pendil ta' Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron[c] ([c])	Quċċata (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Qiegħ (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Pendil ta' Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC_{50} (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

([a]) Medja (n) ± Devjazzjoni Standard (SD) ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi tal-parametri ta' dħul ta' kurva (Ekwazzjoni ta' Hill b'erba parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'erba laboratorji matul l-istudju ta' validazzjoni (ara l-Anness N tar-Referenza 2).

([b]) L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti bħala gwida għall-kriterji ta' aċċettabbiltà.

([c]) L-ittestjar tan-noretindron kien fakultattiv għas-Subkompitu matul l-istudju ta' validazzjoni (ara r-Referenza 2, ara s-Subkompitu 4). B'hekk, ± SD (n) medji ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi ta' dħul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b4 parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa fżewġ laboratorji.
Il-medda għall-IC_{50} *se tkun dipendenti fuq il-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u l-konċentrazzjoni tal-ligand radjotikkettat użati fi ħdan kull laboratorju. Ikun aċċettabbli aġġustament xieraq għall-medda tal-*IC_{50} *fuq il-bażi tal-kundizzjonijiet użati għat-twettiq tal-assaġġ.*

Wiri tal-profiċjenza tal-laboratorju

10. Ara l-paragrafi 17 u 18 u t-Tabella 2 f**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Kull assaġġ (irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv) għandu jikkonsisti fi tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reaġenti) f'jiem differenti, u kull sessjoni għandu jkun fiha tliet repliki.

Determinazzjoni tal-Konċentrazzjoni tar-Riċettur (hrERα)

11. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv tvarja ftit skont il-lott u l-kundizzjonijiet tal-ħżin. Għalhekk, għandha tiġi determinata l-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv kif riċevuta mingħand il-fornitur. Din trendi l-konċentrazzjoni xierqa tar-riċettur attiv fil-ħin tas-sessjoni.

12. Skont il-kundizzjonijiet li jikkorrispondu għall-irbit kompetittiv (jiġifieri 1 nM [^{3}H]-estradjol), konċentrazzjonijiet nominali ta' riċettur ta' 0,25, ta' 0,5, ta' 0,75, u ta' 1 nM għandhom jiġu inkubati fl-assenza (irbit totali) u fil-preżenza (irbit mhux speċifiku ta' 1 µM estradjol mhux tikkettat. L-irbit speċifiku, ikkalkolat bħala d-differenza tal-irbit totali u mhux speċifiku, jiġi plottjat kontra l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti valuri tal-irbit speċifiċi li jikkorrispondu għal 20 % tar-radjotikketta miżjuda hi relatata mal-konċentrazzjoni nominali korrispondenti tar-riċettur, u din il-konċentrazzjoni tar-riċettur għandha tintuża għall-esperimenti tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv. Spiss, konċentrazzjoni finali tal-hrER ta' 0,5 nM se tkun konformi ma' din il-kundizzjoni.

▼M8

13. Jekk il-kriterju ta' 20 % ma jkunx jista' jiġi ssodisfat ripetutament, il-kompożizzjoni tal-esperiment għandha tiġi verifikata għal żbalji potenzjali. Nuqqas ta' lħuq tal-kriterju ta' 20 % jista' jindika li ftit li xejn ikun hemm riċettur attiv fil-lott rikombinanti, u mbagħad ikollu jiġi kkunsidrat l-użu ta' lott ieħor tar-riċettur.

Assaġġ tas-saturazzjoni

14. Tmien konċentrazzjonijiet li jiżdiedu dejjem aktar ta' [^{3}H]17β-estradjol għandhom jiġu evalwati fi triplikat, skont it-tliet kundizzjonijiet li ġejjin (ara t-Tabella 2):

— Fin-nuqqas ta' 17β-estradjol mhux tikkettat u l-preżenza ta' ER. Din hi d-determinazzjoni tal-irbit totali skont il-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet li jkollhom [3H]17β-estradjol biss.

— Fil-preżenza ta' konċentrazzjoni eċċessiva għal 1 000 darba ta' 17β-estradjol mhux tikkettat fuq 17β-estradjol tikkettat u fil-preżenza tal-ER. L-intenzjoni ta' din il-kundizzjoni hi li tissatura s-siti attivi tal-irbit b'17β-estradjol mhux tikkettat, u bil-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet, tiddetermina l-irbit mhux speċifiku. Kwalunkwe estradjol jaħraq li jifdal li jista' jorbot mar-riċettur jitqies li jkun jorbot ma' sit mhux speċifiku peress li l-estradjol kiesaħ għandu jkun f'konċentrazzjoni għolja tant li jintrabat mas-siti speċifiċi disponibbli kollha fuq ir-riċettur.

— Fin-nuqqas ta' 17β-estradjol mhux tikkettat u l-assenza tal-ER (determinazzjoni tar-radjuattività totali)

Preparazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol u ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettati

15. Id-dilwizzjonijiet ta' [^{3}H]-17β-estradjol għandhom jitħejjew billi jiżdied bafer tal-assaġġ sa soluzzjoni ewlenija ta' 12-il nM ta' [^{3}H]-17β-estradjol biex jinkisbu konċentrazzjonijiet li inizjalment ivarjaw minn 0,12nM sa 12 nM. Billi jiżdiedu 40 µl ta' dawn is-soluzzjonijiet għall-bwejriet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (f'volum finali ta' 160 µl), jinkisbu l-konċentrazzjonijiet tal-assaġġ finali, li jvarjaw bejn 0,03 u 3,0 nM. Preparazzjoni tal-bafer tal-assaġġ, tas-soluzzjoni ewlenija ta' [^{3}H]-17β-estradjol u tad-dilwizzjonijiet u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet huma deskritti fid-dettall fil-protokoll FW (2).

16. Id-dilwizzjonijiet ta' soluzzjonijiet etanoloġiċi ta' 17β-estradjol għandhom jitħejjew billi jiżdied bafer tal-assaġġ biex jinkisbu tmien konċentrazzjonijiet waħda akbar mill-oħra li inizjalment ivarjaw bejn 0,06 µM u 6 µM. Billi jiżdiedu 80 µl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (f'volum finali ta' 160 µl), jinkisbu l-konċentrazzjonijiet tal-assaġġ finali, li jvarjaw bejn 0,03µM u 3µM. Il-konċentrazzjoni finali ta' 17β-estradjol mhux tikkettat fil-bwejriet individwali tal-assaġġ tal-irbit mhux speċifiku għandha tkun 1 000 darba l-konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β- estradjol tikkettat. Il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat hi deskritta fid-dettall fil-protokoll FW (2).

17. Għandha tintuża l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur li tagħti l-irbit speċifiku ta' 20±5 % (ara l-paragrafi 12-13). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha titħejja eżatt qabel l-użu.

18. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra jitħejjew kif muri fit-Tabella 2, bi tliet repliki għal kull konċentrazzjoni. Eżempju ta' konċentrazzjoni tal-pjastri u ta' assenjament tal-volum ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' 17β-estradjol mhux tikkettat, tal-bafer u tar-riċettur hu pprovdut fl-Appendiċi 2.2.

▼**M8**

Tabella 2

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Irbit Totali (Solvent)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 µM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 µM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [3H] E_2+ ER+ 0,10 µM E_2			Irbit Mhux Speċifiku
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 µM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 µM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER+ 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 µM E_2			
F													
G													
H													

[3H] E2:: [3H]-17β-estradjol
ER:: riċettur tal-estroġenu
E_2:: 17β-estradjol mhux tikkettat

19. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'2° sa 8°C għal 16 sa 20 siegħa u jitqiegħdu fuq rotatur matul il-perjodu ta' inkubazzjoni.

Kejl ta' [3H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα

20. [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα għandu jiġi separat minn [^{3}H]-17β-Estradjol ħieles billi tiżdied sospensjoni ta' 80 µl DCC kiesaħ f'kull pjastra, filwaqt li l-pjastri għall-mikrotitraġġ jitħawdu għal 10 minuti u jiġu ċentrifugati għal 10 minuti f'madwar 2 500 RPM. Biex tiġi minimizzata d-dissoċjazzjoni tal-[^{3}H]-17β-estradjol marbut mill-hrERα matul dan il-proċess, hu estremament importanti li l-bafers u l-bwejriet tal-assaġġ jinżammu f'bejn 2 u 8°C u li kull stadju jitwettaq malajr. Xejker għall-pjastri għall-mikrotitraġġ hu neċessarju biex il-pjastri jiġu proċessati b'mod effiċjenti u veloċi.

21. Imbagħad 50 µl supernatant li fih [^{3}H]-17β-estradjol marbut mal-hrERα għandu jittieħed b'attenzjoni estrema, biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni tal-bwejriet bil-mess tad-DCC, u għandu jitqiegħed fuq it-tieni pjastra għall-mikrotitraġġ.

22. Imbagħad 200 µl fluwidu ta' xintillazzjoni, li kapaċi jikkonverti l-enerġija kinetika tal-emissjonijiet nukleari f'enerġija tad-dawl, għandu jiżdied f'kull bwejra (A1-B12 u D1 sa E12). Il-bwejriet G1-H12 (identifikati bħala dpms totali) jirrappreżentaw dilwizzjonijiet serjali ta' [^{3}H]-17β-estradjol (40 µl) li għandhom jitwasslu direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejriet tal-pjastra tal-kejl kif indikat fit-Tabella 3, jiġifieri dawn il-bwejriet fihom biss 200 µl fluwidu ta' xintillazzjoni u d-dilwizzjoni xierqa ta' [3H]-17β-estradjol. Dawn il-miżuri juru kemm [^{3}H]-17β-estradjol f'dpms żdied ma' kull sett ta' bwejriet għall-irbit totali u għall-irbit mhux speċifiku.

▼M8

Tabella 3

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni, Kejl tar-Radjuattività

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E_2 + ER			Irbit Totali (Solvent)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 µM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 µM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [3H] E_2+ ER+ 0,10 µM E_2			Irbit Mhux Speċifiku
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 µM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 µM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER+ 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 µM E_2			
F													
G	0,03 nM [3H] E_2 (dpms totali)			0,06 nM [3H] E_2			0,08 nM [3H] E_2			0,10 nM [3H] E_2			Dpms totali (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2			

[3H] E2:: [3H]-17β-estradjol
ER:: riċettur tal-estroġenu
E2:: 17β-estradjol mhux tikkettat
dpms:: diżintegrazzjonijiet fil-minuta
(*) Hawnhekk, id-dilwizzjonijiet serjali jaħarqu ta' estradjol tikkettat [^{3}H] għandhom jiżdiedu direttament f'200 µl fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejriet G1 – H12.

23. Il-kejl għandu jibda wara tal-anqas sagħtejn u l-ħin tal-għadd għandu jkun ta' 40 minuta għal kull bwejra. L-apparat li jkejjel ix-xintillazzjoni tal-pjastri għall-mikrotitraġġ għandu jintuża għad-determinazzjoni tad-dpm/bwejra b'korrezzjoni għall-estinzjoni. Inkella, jekk ma jkunx hemm apparat disponibbli għall-kejl tax-xintillazzjoni għal pjastra għall-mikrotitraġġ, il-kampjuni jistgħu jitkejlu f'apparat konvenzjonali għall-kejl. F'dawn il-kundizzjonijiet, jista' jiġi kkunsidrat tnaqqis fil-ħin tal-għadd.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

24. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [^{3}H]-17β- estradjol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw tliet repliki konkorrenti f'kull konċentrazzjoni fi ħdan sessjoni waħda. Barra minn hekk, għandhom isiru tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għal kull sustanza kimika ttestjata. L-assaġġ għandu jsir fi pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra

Kontrolli

25. Meta jsir l-assaġġ, is-solvent u l-kontrolli konkorrenti (jiġifieri l-estroġenu referenzjarju, il-legant dgħajjef, u dak mhux legant) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Kurvi sħaħ ta' konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dgħajjef u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (bejn wieħed u ieħor l-IC_{50}) kull waħda ta' E2 u ta' legant dgħajjef fi triplikat; (ii) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, tal-anqas kull wieħed fi triplikat. Il-proċeduri għat-ħejjija tal-bafer tal-assaġġ, tal-kontrolli, ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' hrERα u tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma deskritti fir-Referenza 2 (Anness K, ara l-Protokoll tal-Assaġġ FW).

▼**M8**

Kontroll b'solvent:

26. Il-kontroll b'solvent jindika li s-solvent ma jinteraġixxix mas-sistema tat-test u jkejjel ukoll l-irbit totali (TB). L-etanol hu s-solvent preferut. Inkella, jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fl-etanol, jista' jintuża DMSO. Il-konċentrazzjoni ta' etanol jew ta' DMSO, jekk użat, fil-bwejriet finali hi ta' 1,5 % u ma tistax taqbeż it-2 %.

Kontroll bil-bafer:

27. Il-kontroll bil-bafer (BC) la għandu jkun fih solvent u lanqas is-sustanza kimika tat-test, iżda għandu jkun fih il-komponenti l-oħra kollha tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bil-bafer jitqabblu mal-kontroll b'solvent biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ.

Legant b'saħħtu (estroġenu ta' riferiment)

28. 17β-estradjol (CAS 50-28-2) hu l-ligand endoġenu u jorbot b'affinità għolja mal-ER, subtip tal-alfa. Kurva standard li tuża 17β-estradjol mhux tikkettat għandha titħejja għal kull assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrERα, biex tkun tista ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien fi ħdan l-istess laboratorju. Tmien soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jitħejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ li jvarjaw minn 100 nM – 10 pM (-7[logM] sa -11[logM]), imqassma kif ġej: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). L-ogħla konċentrazzjoni ta' 17β-estradjol mhux tikkettat (1 μM) isservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku. Din il-konċentrazzjoni hi distinta bit-tikketta NSB fit-Tabella 4 għalkemm hi wkoll parti mill-kurva standard.

Legant dgħajjef

29. Legant dgħajjef (noretinodrel (CAS68-23-5) jew noretindron (CAS 68-22-4)) għandu jkun inkluż biex tintwera s-sensittività ta' kull esperiment u tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien. Tmien soluzzjonijiet tal-legant dgħajjef għandhom jitħejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ li jvarjaw minn 3 nM sa 30 μM (-8,5[logM] sa -4,5[logM]), imqassma kif ġej: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM],-7,5[logM], -8,5[logM].

Mhux legant

30. Ottiltrietossisilan (OTES, CAS 2943-75-1) għandu jintuża bħala l-kontroll negattiv (mhux legant). Dan jipprovdi garanzija li l-assaġġ kif imwettaq isib meta s-sustanzi kimiċi tat-test ma jorbtux mal-hrERα. Tmien soluzzjonijiet ta' mhux legant għandhom jitħejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ li jvarjaw minn 0,1nM sa 1 000 μM (-10[logM] sa -3[logM]), f'inkrementi tal-log. Il-ftalat tad-di-*n*-butil (DBP) jista' jintuża bħala mhux legant tal-kontroll alternattiv. Is-solubbiltà massima tiegħu ntweriet li hi -4[logM].

Konċentrazzjoni tal-hrERα

31. Għandu jintuża l-ammont tar-riċettur li jagħti l-irbit speċifiku ta' 20±5 % ta' 1 nM radjoligand (ara l-paragrafi 12-13 tal-Appendiċi 2). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha titħejja eżatt qabel l-użu.

[3H]-17β-estradjol

32. Il-konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol fil-bwejriet tal-assaġġ għandha tkun ta' 1,0 nM.

▼M8

Sustanzi Kimiċi tat-Test

33. L-ewwel nett, hemm bżonn li jsir test tas-solubbiltà biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir il-protokoll tat-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1 mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'kontroll b'solvent flimkien ma' tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdew bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat (ara wkoll il-paragrafu 35). Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata bl-użu tal-kurvi spazjati tal-konċentrazzjoni bi tmien logs kif definiti mit-test preċedenti ta' sejbien tal-medda. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons.

34. Id-dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jitħejjew fis-solvent xieraq (ara l-paragrafu 26 tal-Appendiċi 2). Jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fl-etanol jew fid-DMSO, u ż-żieda ta' aktar solvent tkun tirriżulta f'konċentrazzjoni tas-solvent ogħla mil-limitu aċċettabbli fit-tubu finali, l-ogħla konċentrazzjoni tista' titnaqqas għall-anqas konċentrazzjoni li jmiss. F'dan il-każ, konċentrazzjoni addizzjonali tista' tiżdied fil-limitu inferjuri tas-serje ta' konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet oħra fis-serje għandhom jibqgħu l-istess.

35. Is-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ssorveljati bir-reqqa meta jiżdiedu mal-bwejra tal-assaġġ, peress li s-sustanza kimika tat-test tista' tfur barra maż-żieda fil-bwejra tal-assaġġ. Id-*data* għall-bwejriet kollha li fihom il-preċipitat għandha tkun esklużа mid-dħul ta' kurva, u r-raġuni għall-esklużjoni tad-*data* għandha tiġi nnotata.

36. Jekk hemm informazzjoni eżistenti preċedenti minn sorsi oħra li jipprovdu log(IC_{50}) ta' sustanza kimika tat-test, jista jkun xieraq li d-dilwizzjonijiet jitqassmu ġeometrikament (jiġifieri 0,5 unitajiet ta' log madwar il-log mistenni log(IC_{50}). Ir-riżultat finali għandu jirrifletti tifrix suffiċjenti tal-konċentrazzjonijiet fuq iż-żewġ naħat tal-log(IC_{50}), inklużi l-quċċata u l-qiegħ, b'tali mod li l-kurva tal-irbit tkun tista tiġi karatterizzata b'mod adegwat.

Organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ

37. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tikkettatti għandhom jitħejjew b'kunsiderazzjoni ta' inkubazzjonijiet sestupli b'kodiċijiet għall-kontroll b'solvent, bl-ogħla konċentrazzjoni tal-estroġenu referenzjarju li sservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku (NSB), u bil-kontroll b'bafer u b'kunsiderazzjoni tal-inkubazzjonijiet triplikati bil-kodiċijiet għal kull waħda mit-tmien konċentrazzjonijiet tal-kontroll li ma jorbotx (ottiltrietossisilan), bis-seba' konċentrazzjonijiet inferjuri għall-estroġenu referenzjarju, bit-tmien livelli tad-doża tal-konċentrazzjonijiet tal-legant dgħajjef, u bit-tmien konċentrazzjonijiet ta' kull sustanza kimika tat-test (TC). Tifsila indikattiva tad-dijagramma tal-pjastra għall-kurvi sħaħ tal-konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontroll referenzjarji hi mogħtija hawn taħt fit-Tabella 4. Jintużaw pjastri addizzjonali għall-mikrotitraġġ għas-sustanzi kimiċi tat-test u dawn għandhom jinkludu kontrolli tal-pjastra (jiġifieri 1) u konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (madwar l-IC_{50}) kull waħda ta' E2 u legant dgħajjef fi triplikat; 2) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, kull wieħed f'sestuplu (Tabella 5). Eżempju ta' worksheet tat-tifsila tal-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ kompetittiv bl-użu ta' tliet sustanzi kimiċi tat-test mhux magħrufa hu pprovdut fl-Appendiċi 2.3. Il-konċentrazzjonijiet indikati fit-Tabelli 4 u 5 huma l-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni masisma għall-E2 għandha tkun ta' 1×10^{-7} M u għal-legant dgħajjef

▼M8

għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni użata għal-legant dgħajjef fil-pjastra 1. Il-konċentrazzjoni tal-IC_{50} trid tiġi determinata mil-laboratorju fuq il-bażi tal-bażi ta' *data* tal-kontroll storiku tiegħu. Hu mistenni li dan il-valur ikun simili għal dak osservat fl-istudji ta' validazzjoni (ara t-Tabella 1).

Tabella 4

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Kurvi Sħaħ ta' Konċentrazzjoni għal Estroġenu u għal Kontrolli Referenzjarji (Pjastra 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB (Solvent biss)			TB (Solvent biss)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10-7)			E2 (1×10-8)			E2 (1×10-8,5)			E2 (1×10-9)		
C	E2 (1×10-9,5)			E2 (1×10-10)			E2 (1×10-11)			Inbjank (*)		
D	NE (1×10-4,5)			NE (1×10-5)			NE (1×10-5,5)			NE (1×10-6)		
E	NE (1×10-6,5)			NE (1×10-7)			NE (1×10-7,5)			NE (1×10-8,5)		
F	OTES (1×10-3)			OTES (1×10-4)			OTES (1×10-5)			OTES (1×10-6)		
G	OTES (1×10-7)			OTES (1×10-8)			OTES (1×10-9)			OTES (1×10-10)		
H	Inbjank (għal dak jaħraq) (**)			Inbjank (għal dak jaħraq) (**)			Kontroll bil-bafer			Kontroll bil-bafer		

F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)
(*) inbjank veru, bwejra mhux użata
(**) inbjank mhux użat matul l-inkubazzjoni, iżda użat biex tiġi kkonfermata r-radjuattività totali miżjuda.

Tabella 5

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Kurvi Sħaħ ta' Konċentrazzjoni għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u għall-Kontrolli tal-Pjastri.

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB (Solvent biss)			TB (Solvent biss)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10-3)			TC1 (1×10-4)			TC1 (1×10-5)			TC1 (1×10-6)		
C	TC1 (1×10-7)			TC1 (1×10-8)			TC1 (1×10-9)			TC1 (1×10-10)		
D	TC2 (1×10-3)			TC2 (1×10-4)			TC2 (1×10-5)			TC2 (1×10-6)		
E	TC2 (1×10-7)			TC2 (1×10-8)			TC2 (1×10-9)			TC2 (1×10-10)		
F	TC3 (1×10-3)			TC3 (1×10-4)			TC3 (1×10-5)			TC3 (1×10-6)		
G	TC3 (1×10-7)			TC3 (1×10-8)			TC3 (1×10-9)			TC3 (1×10-10)		
H	NE (IC_{50})			NE (1×10-4,5)			E2 ($IC_{>50}$)			E2 (1×10-7)		

F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)

▼M8

Tlestija tal-assaġġ tal-irbit kompetittiv

38. Kif muri fit-Tabella 6, għandhom jiżdiedu fil-bwejriet 80 µl tal-kontroll b'solvent, tal-kontroll bil-bafer, tal-estroġenu referenzjarju, tal-legant dgħajjef, tal-mhux legant, u tas-sustanzi kimiċi tat-test imħejjija f'bafer tal-assaġġ. Imbagħad, f'kull bwejra għandha tiżdied soluzzjoni ta' 4 nM [3H]-17β-estradjol. Wara rotazzjoni bil-galbu għal 10 sa 15-il minuta bejn 2° sa 8°C, għandha tiżdied soluzzjoni ta' 40 µl hrERα. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'2° sa 8°C għal 16 sa 20 siegħa u jitqiegħdu fuq rotatur matul il-perjodu ta' inkubazzjoni.

Tabella 6

Volum tal-Komponenti tal-Assaġġ għall-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv tal-hrER, Pjastri għall-Mikrotitraġġ

Volum (µl)	Kostitwent
80	17β-estradjol mhux tikkettat, noretinodrel, OTES, sustanzi kimiċi tat-test, solvent jew bafer
40	soluzzjoni ta' 4 nM [^{3}H]-17β-estradjol
40	soluzzjoni ta' hrERα, konċentrazzjoni kif determinata
160	*Volum totali f'kull bwejra tal-assaġġ*

39. Imbagħad għandha ssir il-kwantifikazzjoni ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα, wara separazzjoni ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα minn [^{3}H]-17β-Estradjol ħieles billi tiżdied sospensjoni ta' 80 µl DCC kiesaħ f'kull bwejra, kif deskritt fil-paragrafi 20-23 għall-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.

40. Il-bwejriet H1-6 (identifikati bħala inbjank (għal dawk jaħarqu) fit-tabella 4) jirrappreżentaw id-dpms tal-estradjol tikkettat [^{3}H] f'40 µl. L-alikwota ta' 40 µl għandha titwassal direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejriet H1 – H6.

Kriterji ta' aċċettabbiltà

Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

41. Il-kurva tal-irbit speċifiku għandha tilħaq plateau hekk kif jintużaw konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [^{3}H]-17β-estradjol, li tindika saturazzjoni tal-hrERα bil-ligand.

42. Il-ligand speċifiku f'1 nM [3H]-17β-estradjol għandu jkun ġewwa l-medda aċċettabbli ta' 15 % sa 25 % tar-radjuattività totali mkejla medja miżjuda fis-sessjonijiet. Ħruġ ħafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata u l-assaġġ tas-saturazzjoni għandu jerġa' jsir.

43. Id-*data* għandha tipproduċi plott Scatchard lineari.

44. L-irbit mhux speċifiku ma għandux ikun eċċessiv. Il-valur għall-irbit mhux speċifiku tipikament għandu jkun ta' <35 % tal-irbit totali. Madankollu, il-proporzjon jista' kultant jaqbeż dan il-limitu meta titkejjel dpm baxxa ħafna għall-anqas konċentrazzjoni ta' 17β-Estradjol radjotikkettat ittestjat.

▼**M8**

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

45. Konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jispostaw [^{3}H]-17β-estradjol mir-riċettur b'mod konsistenti b'irbit kompetittiv f'sit wieħed.

46. Il-valur tal-IC_{50} għall-estroġenu ta' riferiment (jiġifieri 17β-estradjol) għandu jkun bejn wieħed u ieħor daqs il-konċentrazzjoni molari ta' [^{3}H]-17β-estradjol flimkien ma' Kd determinat mill-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.

47. L-irbit speċifiku totali għandu jkun konsistentement fi ħdan il-medda aċċettabbli ta' 20 ± 5 % meta l-konċentrazzjoni mkejla medja tar-radjuattività totali miżjuda f'kull bwejra tkun ta' 1 nM fis-sessjonijiet. Ħruġ ħafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata.

48. Is-solvent ma għandux ibiddel is-sensittività jew ir-riproduċibbiltà tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bis-solvent (bwejriet tat-TB) jitqabblu mal-kontroll bil-bafer biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ. Ir-riżultati tat-TB u tal-kontroll bil-Bafer għandhom ikunu komparabbli jekk ma jkun hemm ebda effett tas-solvent fuq l-assaġġ.

49. Il-mhux legant ma għandux jisposta aktar minn 25 % tal-[^{3}H]-17β-estradjol mill-hrERα meta jiġi ttestjat sa 10^{-3} M (OTES) jew 10^{-4} M (DBP).

50. Il-kriterji tal-prestazzjoni ġew żviluppati għall-estroġenu ta' referenza u għal żewġ leganti dgħajfin (eż. noretinodrel, noretindron) bl-użu tad-*data* mill-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ FW tal-Irbit tal-hrER (Anness N ta' Riferiment 2). L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti għal (n) +/- SD medja għas-sessjonijiet tal-kontroll kollha bejn il-laboratorji li jieħdu sehem fl-istudju ta' validazzjoni. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % ġew ikkalkolati għall-parametri ta' dħul ta' kurva (jiġifieri l-quċċata, il-qiegħ, Hillslope, logIC_{50}) għall-estroġenu referenzjarju u għal-leganti dgħajfin u għal-log_{10}RBA tal-leganti dgħajfin relattivi għall-estroġenu referenzjarju u huma pprovduti bħala kriterji tal-prestazzjoni għall-kontrolli pożittivi. It-Tabella 1 tipprovdi l-meded mistennija għall-parametri ta' dħul ta' kurva li jistgħu jintużaw bħala kriterji tal-prestazzjoni. Fil-prattika, il-medda tal-IC_{50} tista' tvarja ftit fuq il-bażi tal-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u tal-konċentrazzjoni tal-ligand.

51. Ma ġie żviluppat ebda kriterju tal-prestazzjoni għall-parametri ta' dħul ta' kurva għas-sustanzi kimiċi tat-test minħabba l-firxa vasta ta' sustanzi kimiċi tat-test potenzjali eżistenti u l-varjazzjoni fl-affinitajiet u fl-eżiti potenzjali (eż. Kurva sħiħa, kurva parzjali, ebda dħul ta' kurva). Madankollu, għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati minn kull sessjoni għal kull sustanza kimika tat-test. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċċata (eż. 90 - 100 % tal-irbit) tal-kurva kompetittiva. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-3 sessjonijiet mhux konkorrenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-kontrolli minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għandhom joqorbu lejn il-kejlijiet tal-prestazzjoni rrapportati għal dan l-assaġġ FW u jkunu konsistenti mad-*data* storika tal-kontrolli minn kull laboratorju rispettiv.

▼M8

ANALIŻI TAD-*DATA*

Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

52. Jitkejjel l-irbit totali kif ukoll dak mhux speċifiku. Minn dawn il-valuri, l-irbit speċifiku tal-konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [^{3}H]-17β-estradjol f'kundizzjonijiet ta' ekwilibriju jiġi kkalkolat bit-tnaqqis tal-mhux speċifiku mit-total. Graff tal-irbit speċifiku kontra l-konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol għandha tilħaq plateau għall-irbit speċifiku massimu li tindika saturazzjoni tal-hrERα bl-[^{3}H]-17β-estradjol. Barra minn hekk, l-analiżi tad-*data* għandha tiddokumenta l-irbit ta' [^{3}H]-17β- estradjol ma' sit ta' rbit wieħed b'affinità għolja. L-irbit mhux speċifiku, totali u speċifiku għandu jintwera fuq kurva tal-irbit tas-saturazzjoni. Analiżi ulterjuri ta' din id-*data* għandha tuża analiżi ta' rigressjoni mhux lineari (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) b'wiri finali tad-*data* bħala plot Scatchard.

53. L-analiżi tad-*data* għandha tiddetermina l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit totali biss, bl-użu tas-suppożizzjoni li l-irbit mhux speċifiku hu lineari, sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għall-użu ta' metodu differenti. Barra minn hekk, ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Il-korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. bl-użu tal-metodu ta' Swillens 1995) dejjem għandha tintuża meta jiġu determinati l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

54. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tiġi plottjata bħala irbit speċifiku ta' [^{3}H]-17β-estradjol kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log10) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta' [^{3}H]-17β hi l-valur tal-IC_{50}.

55. Stimi tal-valuri tal-log (IC_{50}) għall-kontrolli pożittivi (eż. estroġenu referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Il-quċċata, il-qiegħ, il-pendil u l-log(IC_{50}) ġeneralment għandhom jitħallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Ma għandhiex tintuża korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tiġi rieżaminata biex jiġi żgurat dħul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef għandha tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC_{50}) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC_{50}) għal 17β-estradjol. Ir-riżultati mill-kontrolli pożittivi u mill-kontroll mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-miżuri tal-prestazzjoni tal-assaġġ fil-paragrafi 45-50 f'dan l-Appendiċi 2.

56. Id-*data* għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tiġi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tiġi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tiġi klassifikata kif suppost. Hu rakkomandat li kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel issirilha analiżi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estroġenu referenzjarju u għall-kontrolli tal-legant dgħajjef (ara l-paragrafu 55 aktar 'il fuq). Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dħul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidħol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv ġenerata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta' tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [^{3}H]-17β-estradjol marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni kimika, u l-konsistenza fil-parametri mdaħħla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analiżijiet tad-*data* saru kif suppost.

▼M8

Interpretazzjoni tad-*data*

57. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà, sustanza kimika tat-test titqies li tkun legant għall-hrERα jekk kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons fi ħdan il-medda tad-*data* jkun anqas minn 50 % (Figura 1).

58. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li mhix legant għall-hrERα jekk:

— Kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi ħdan il-medda tad-*data* jkun ogħla minn 75 %, jew

— Kurva tal-irbit ma tkunx tista' tiddaħħal u l-anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* jkun ogħla minn 75 %.

59. Is-sustanzi kimiċi tat-test jitqiesu ekwivoċi jekk ma tiġi ssodisfata l-ebda waħda mill-kundizzjonijiet ta' hawn fuq (eż. l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla jkun bejn 76 – 51 %).

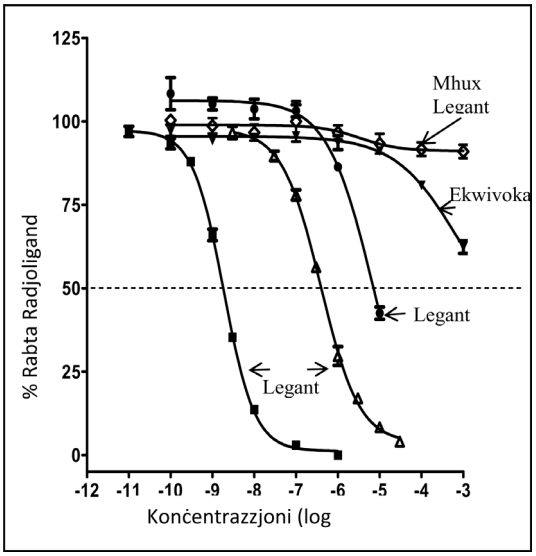
Tabella 7

Kriterji għall-assenjazzjoni tal-klassifikazzjoni fuq il-bażi tal-kurva tal-irbit kompetittiv għal sustanza kimika tat-test.

Klassifikazzjoni	Kriterji
Legant[a]	Kurva tal-irbit tista' tiddaħħal. L-**anqas punt fil-kurva tar-rispons fi ħdan il-medda tad-*data* hu anqas minn 50 %.**
Mhux Legant[b]	Jekk tista' tiddaħħal kurva tal-irbit, l-**anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi ħdan il-medda tad-*data* hu akbar minn 75 %.** Jekk ma tistax tiddaħħal kurva tal-irbit, l-**anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* hu ogħla minn 75 %.**
Ekwivoka[c]	Kwalunkwe sessjoni li tista' tiġi ttestjata la hi legant u lanqas mhux legant (*eż.* L-anqas punt fil-kurva mdaħħla tar-rspons hu bejn 76 – 51 %).

Figura 1

Eżempji ta' klassifikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test bl-użu ta' kurva tal-irbit kompetittiv.



▼**M8**

60. Diversi sessjonijiet imwettqa fi ħdan laboratorju għal sustanza kimika tat-test jiġu kombinati bl-assenjazzjoni ta' valuri numeriċi għal kull sessjoni u bit-teħid tal-medja bejn is-sessjonijiet kif muri fit-Tabella 8. Ir-riżultati għas-sessjonijiet kombinati fi ħdan kull laboratorju jitqabblu mal-klassifikazzjoni mistennija għal kull sustanza kimika tat-test.

Tabella 8

Il-metodu għall-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bl-użu ta' diversi sessjonijiet fi ħdan laboratorju

Biex jiġi assenjat valur għal kull sessjoni:	
Klassifikazzjoni	Valur Numeriku
Legant	2
Ekwivoka	1
Mhux legant	0
Biex tiġi klassifikata medja ta' valur numeriku fuq diversi sessjonijiet:	
Klassifikazzjoni	Valur Numeriku
Legant	Medja $\geq$ 1,5
Ekwivoka	0,5 $\leq$ Medja < 1,5
Mhux legant	Medja < 0,5

RAPPORT TAT-TEST

61. Ara l-paragrafu 24 ta' "**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**" ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼**M8**

Appendiċi 2.1

LISTA TA' TERMINI

[^{3}H]E2: 17β-Estradjol radjotikkettat bi tritju

DCC: Faħam miksi bid-dekstran

E_2: 17β-estradjol mhux tikkettat (inert)

Bafer tal-assaġġ: 10 mM Tris, 10 mg Albumina tas-Serum tal-Bovini /ml, 2 mM DTT, 10 % gliċerol, 0,2 mM lewpeptina, pH 7,5

hrERα: Riċettur alfa tal-estroġenu rikombinanti uman

Replika: Waħda mid-diversi bwejriet li jkun fihom l-istess kontenut fl-istess konċentrazzjonijiet u li jiġu ttestjati b'mod konkorrenti fi ħdan sessjoni waħda. F'dan il-protokoll, kull konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata fi triplikat; jiġifieri, hemm tliet repliki li jiġu assaġġati fl-istess ħin f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Sessjoni: Sett sħiħ ta' bwejriet ta' assaġġ ta' pjastra għall-mikrotitraġġ f'sessjoni konkorrenti li jipprovdi l-informazzjoni neċessarja kollha biex jiġi karatterizzat l-irbit ta' sustanza kimika tat-test mal-hrERα (viz., it-total [^{3}H]-17β-estradjol miżjud fil-bwejra tal-assaġġ, l-irbit massimu ta' [^{3}H]-17β-estradjol mal-hrERα, l-irbit mhux speċifiku, u l-irbit totali f'diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test). Sessjoni tista' tikkonsisti fi bwejra tal-assaġġ waħda biss (jiġifieri replika) għal kull konċentrazzjoni, iżda peress li dan il-protokoll jeħtieġ assaġġar fi triplikat, sessjoni waħda tikkonsist fi tliet bwejriet tal-assaġġ għal kull konċentrazzjoni. Barra minn hekk, dan il-protokoll jeħtieġ tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri mhux konkorrenti) għal kull sustanza kimika.

▼**M8**

Appendiċi 2.2

ASSAĠĠ TIPIKU TAS-SATURAZZJONI TA' [^{3}H]-17B-ESTRADJOL BI TLIET BWEJRIET REPLIKI

Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki

Pożizzjoni	Replika	Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra	Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Jahraq (nM)	Volum ta' E2 Jahraq (µl)	Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Jahraq (nM)	Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Kiesah (µM)	Volum ta' E2 Kiesah (µl)	Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Kiesah (µM)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tar-Riċettur (µl)	Volum totali fil-bwejriet
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼M8

Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki

Pożizzjoni	Replika	Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra	Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Jahraq (nM)	Volum ta' E2 Jahraq (µl)	Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Jahraq (nM)	Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Kiesaħ (µM)	Volum ta' E2 Kiesaħ (µl)	Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Kiesaħ (µM)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tar-Riċettur (µl)	Volum totali fil-bwejriet
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki

Pożizzjoni	Replika	Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra	Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Jahraq (nM)	Volum ta' E2 Jahraq (µl)	Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Jahraq (nM)	Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Kiesah (µM)	Volum ta' E2 Kiesah (µl)	Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Kiesah (µM)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tar-Riċettur (µl)	Volum totali fil-bwejriet
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Jaħraq	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Jaħraq	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Jaħraq	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Jaħraq	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Jaħraq	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Jaħraq	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Jaħraq	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Jaħraq	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Jaħraq	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Jaħraq	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Jaħraq	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Jaħraq	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki

Pożizzjoni	Replika	Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra	Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Jaħraq (nM)	Volum ta' E2 Jaħraq (µl)	Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Jaħraq (nM)	Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Kiesaħ (µM)	Volum ta' E2 Kiesaħ (µl)	Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Kiesaħ (µM)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tar-Riċettur (µl)	Volum totali fil-bwejriet
H1	1	Jaħraq	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Jaħraq	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Jaħraq	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Jaħraq	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Jaħraq	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Jaħraq	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Jaħraq	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Jaħraq	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Jaħraq	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Jaħraq	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Jaħraq	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Jaħraq	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Kun af li l-bwejriet "jaħarqu" jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-40 µl jiżdiedu biss għall-għadd tax-xintillazzjoni.

▼**M8**

Appendiċi 2.3:

TIFSILA TAL-BWEJRIET TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT KOMPETITTIV

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	A1	1	irbit totali	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	irbit totali	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	irbit totali	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	irbit totali	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	irbit totali	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	irbit totali	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	E2 kiesaħ	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	E2 kiesaħ	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	E2 kiesaħ	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	E2 kiesaħ	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	B5	2	E2 kiesaħ	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	E2 kiesaħ	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	E2 kiesaħ	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	E2 kiesaħ	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	E2 kiesaħ	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	E2 kiesaħ	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	E2 kiesaħ	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	E2 kiesaħ	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	E2 kiesaħ	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	E2 kiesaħ	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	E2 kiesaħ	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	E2 kiesaħ	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	E2 kiesaħ	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	E2 kiesaħ	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	E2 kiesaħ	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	E2 kiesaħ	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	C9	3	E2 kiesaħ	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	inbjank	inbjank	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	inbjank	inbjank	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	inbjank	inbjank	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	L	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	L	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	L	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	L	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	L	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	L	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	L	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	L	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	L	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	L	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	L	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	L	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	L	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	L	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	L	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	L	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	L	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jaħraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	G6	3	OTES	L	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	L	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	L	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	L	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	L	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	L	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	L	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	H1	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Kun af li l-bwejriet "jaħarqu" jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-40 µl jiżdiedu biss għall-għadd tax-xintillazzjoni.

▼M8

Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv												
Pjastra	**Pożizzjoni**	**Replika**	**Tip ta' bwejra**	**Kodiċi tal-Bwejra**	**Kodiċi tal-Konċentrazzjoni**	**Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)**	**Stokk tal-hrER (µL)**	**Volum tal-Bafer (µL)**	**Volum tat-Tračċatur (E2 Jahraq) (µL)**	**Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)**	**Volum Finali (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)**
P1	A1	1	irbit totali	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	irbit totali	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	irbit totali	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	irbit totali	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	irbit totali	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	irbit totali	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv												
Pjastra	**Pożizzjoni**	**Replika**	**Tip ta' bwejra**	**Kodiċi tal-Bwejra**	**Kodiċi tal-Konċentrazzjoni**	**Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)**	**Stokk tal-hrER (µL)**	**Volum tal-Bafer (µL)**	**Volum tat-Tračċatur (E2 Jahraq) (µL)**	**Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)**	**Volum Finali (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)**
P1	C1	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv												
Pjastra	**Pożizzjoni**	**Replika**	**Tip ta' bwejra**	**Kodiċi tal-Bwejra**	**Kodiċi tal-Konċentrazzjoni**	**Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)**	**Stokk tal-hrER (µL)**	**Volum tal-Bafer (µL)**	**Volum tat-Tračċatur (E2 Jahraq) (µL)**	**Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)**	**Volum Finali (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)**
P1	E1	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv												
Pjastra	**Pożizzjoni**	**Replika**	**Tip ta' bwejra**	**Kodiċi tal-Bwejra**	**Kodiċi tal-Konċentrazzjoni**	**Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)**	**Stokk tal-hrER (µL)**	**Volum tal-Bafer (µL)**	**Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)**	**Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)**	**Volum Finali (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)**
P1	G1	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 kiesaħ S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 kiesaħ S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 kiesaħ S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 kiesaħ S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 kiesaħ S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 kiesaħ S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Appendiċi 3

L-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU *IN VITRO* BL-UŻU TA' PROTEINA TAD-DOMINJU TAL-IRBIT TAL-LIGAND TAL-ERA RIKOMBINANTI TAL-CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. Dan l-assaġġ *in vitro* tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv tar-Riċettur tal-Estroġenu (Erα) juża dominju tal-irbit tal-ligand (LBD) tal-ERα uman (hrERα). Din il-binja tal-proteina ġiet prodotta mill-Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), fil-Ġappun, u teżisti bħala proteina ta' fużjoni ta' glutatjon-S-transferaži (GST), u hi espressa fl-*E. coli*. Il-protokoll CERI għadda minn studju ta' validazzjoni multilaboratorju internazzjonali (2) li wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tiegħu għall-iskop maħsub tal-assaġġ.

2. Dan l-assaġġ hu proċedura ta' skrinjar għall-identifikazzjoni ta' sustanzi li jistgħu jorbtu mal-hrERα. Jintuża biex jiddetermina l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tikkompeti ma' 17β-estradjol għall-irbit mal-hrERα-LBD. Ir-riżultati kwantitattivi tal-assaġġ jistgħu jinkludu l-IC_{50} (kejl tal-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test meħtieġa biex jiġi spostat nofs l-[^{3}H]-17β-estradjol mill-hrERα) u l-affinitajiet għall-irbit relattiv tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-hrERα meta mqabbel ma' 17β-estradjol. Għall-finijiet ta' skrinjar tas-sustanzi kimiċi, ir-riżultati kwalitattivi aċċettabbli tal-assaġġ jistgħu jinkludu klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test bħala leganti tal-hrERα, mhux leganti, jew ekwivoċi fuq il-bażi tal-kriterji deskritti għall-kurvi tal-irbit.

3. L-assaġġ juża ligand radjuattiv li jeħtieġ liċenzja tal-materjali radjuattivi għal-laboratorju. Il-proċeduri kollha b'radjoisotopi u b'sustanzi kimiċi perikoluži għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri deskritti mil-leġiżlazzjoni nazzjonali.

4. Għandhom jinqraw "**INTRODUZZJONI ĠENERALI**" u "**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJI TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. L-assaġġ tal-irbit tal-hrERα jkejjel il-ħila ta' ligand radjotikkettat ([^{3}H]17β-estradjol) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu mal-ligand radjotikkettat f'konċentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawk is-sustanzi kimiċi b'affinità inferjuri għar-riċettur.

6. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.

▼M8

7. L-iskop tal-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni hu li jikkaratterizza lott partikolari ta' riċetturi għall-affinità u n-numru tal-irbit bi tħejjija għall-esperiment tal-irbit kompetittiv. L-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni jkejjel, taħt kundizzjonijiet ta' ekwilibriju, l-affinità ta' konċentrazzjoni fissa tar-riċettur tal-estroġenu għal-ligand naturali tiegħu (rappreżentat mill-kostanti ta' dissoċjazzjoni, Kd), u l-konċentrazzjoni tas-siti attivi tar-riċettur (Bmax).

8. L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-affinità ta' sustanza biex tikkompeti ma' [^{3}H]17β-estradjol għall-irbit mal-ER. L-affinità hi kwantifikata mill-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li, f'ekwilibriju, tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku tal-[^{3}H]17β-estradjol (imsejħa l-"konċentrazzjoni inibitorja 50 %" jew IC_{50}). Din tista' tiġi evalwata wkoll bl-użu tal-affinità relattiva għall-irbit (RBA, relattiva għall-IC_{50} tal-estradjol imkejla b'mod separat fl-istess sessjoni). L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' [^{3}H]17β-estradjol f'konċentrazzjoni fissa fil-preżenza ta' firxa wiesgħa (tmien ordnijiet ta' kobor) tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad id-*data* tiddaħħal, fejn possibbli, biex tifforma l-ekwazzjoni ta' Hill (Hill, 1910) li tiddeskrivi l-ispostament tar-radjoligand minn legant kompetittiv ta' sit wieħed. Il-firxa tal-ispostament tal-estradjol radjotikkettat fl-ekwilibriju tintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi karatterizzata bħala legant, mhux legant, jew waħda li tiġġenera rispons ekwivoku.

PROĊEDURA

Wiri ta' Prestazzjoni Aċċettabbli tal-Proteina tal-hrERα

9. Qabel it-twettiq ta' rutina tal-assaġġi tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv, għandu jintwera li kull lott ġdid tal-hrERα jkollu prestazzjoni korretta fil-laboratorju fejn se jintuża. Għandu jintuża proċess imqassam fuq żewġ stadji biex tintwera l-prestazzjoni. Dawn l-istadji huma dawn li ġejjin:

— Agħmel assaġġ tal-irbit ta' [3H]-17β-estradjol tas-saturazzjoni biex turi l-ispeċifiċità u s-saturazzjoni tal-hrERα. Analiżi ta' rigressjoni nonlineari ta' din id-*data* (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) u l-plott Scatchard sussegwenti għandha tiddokumenta l-affinità għall-irbit tal-hrERα ta' [3H]-17β-estradjol (Kd) u n-numru ta' riċetturi (Bmax) għal lott partikolari tal-hrERα.

— Agħmel assaġġ tal-irbit kompetittiv billi tuża s-sustanzi tal-kontroll (estroġenu ta' riferiment (17β-estradjol), legant dgħajjef (eż. noretinodrel jew noretindron), u mhux legant (ottiltrietossisilan, OTES). Kull laboratorju għandu jistabbilixxi bażi ta' *data* storika biex jiddokumenta l-konsistenza tal-IC50 u tal-valuri rilevanti għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef fost l-esperimenti u l-lottijiet differenti tal-hrERα. Barra minn hekk, il-parametri tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għas-sustanzi tal-kontroll għandhom ikunu fi ħdan il-limiti tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (ara t-Tabella 1) li ġew żviluppati bl-użu tad-*data* mil-laboratorji li ħadu sehem fl-istudju ta' validazzjoni għal dan l-assaġġ (2).

Tabella 1

Kriterji tal-prestazzjoni żviluppati għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef, Assaġġ CERI tal-Irbit tal-hrER.

Sustanza	Parametru	Medja ([a])	Devjazzjoni Standard(n)	Intervall ta' Kunfidenza ta' 95 % ([b])	
				Limitu Inferjuri	Limitu Superjuri
17β-estradjol	Quċċata	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Qiegħ	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼**M8**

Sustanza	Parametru	Medja (a)	Devjazzjoni Standard(n)	Intervall ta' Kunfidenza ta' 95 % (b)	
				Limitu Inferjuri	Limitu Superjuri
	HillSlope	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretinodrel	Quċċata	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Qiegħ	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	HillSlope	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretindron (c)	Quċċata	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Qiegħ	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Pendil ta' Hill	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

(a) Medja ± Devjazzjoni Standard (SD) bid-daqs tal-kampjun (n) ġiet ikkalkolata bl-użu tal-istimi ta' dħul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'erba' laboratorji matul l-istudju ta' validazzjoni (ara l-Anness N tar-referenza 2).

(b) L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti bħala gwida għall-kriterji ta' aċċettabbiltà.

(c) L-ittestjar tan-noretindron kien fakultattiv għas-Subkompitu matul l-istudju ta' validazzjoni (ara r-Referenza 2, ara s-Subkompitu 4). B'hekk, ± SD (n) medji ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi ta' dħul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'żewġ laboratorji.
Il-medda għall-IC_{50} se tkun dipendenti fuq il-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u l-konċentrazzjoni tal-ligand radjotikkettat użati fi ħdan kull laboratorju. Ikun aċċettabbli aġġustament xieraq għall-medda tal-IC_{50} fuq il-bażi tal-kundizzjonijiet użati għat-twettiq tal-assaġġ.

Wiri tal-profiċjenza tal-laboratorju

10. Ara l-paragrafi 17 u 18 u t-Tabella 2 f'"**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**" ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Kull assaġġ (irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv) għandu jikkonsisti fi tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reaġenti) f'jiem differenti, u kull sessjoni għandu jkun fiha tliet repliki.

Determinazzjoni tal-Konċentrazzjoni tar-Riċettur (hrERα)

11. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv tvarja ftit skont il-lott u l-kundizzjonijiet tal-ħżin. Għalhekk, għandha tiġi determinata l-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv kif riċevuta mingħand il-fornitur. Din trendi l-konċentrazzjoni xierqa tar-riċettur attiv fil-ħin tas-sessjoni.

12. Skont il-kundizzjonijiet li jikkorrispondu għall-irbit kompetittiv (jiġifieri 0,5 nM [^{3}H]-estradjol), konċentrazzjonijiet nominali ta' riċettur ta' 0,1, ta' 0,2, ta' 0,4, u ta' 0,6 nM għandhom jiġu inkubati fl-assenza (irbit totali) u fil-preżenza (irbit mhux speċifiku ta' 1 μM estradjol mhux tikkettat. L-irbit

▼M8

speċifiku, ikkalkolat bħala d-differenza tal-irbit totali u mhux speċifiku, jiġi plottjat kontra l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti valuri tal-irbit speċifiċi li jikkorrispondu għal 40 % tar-radjotikketta miżjuda hi relatata mal-konċentrazzjoni korrispondenti tar-riċettur, u din il-konċentrazzjoni tar-riċettur għandha tintuża għall-esperimenti tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv. Spiss, konċentrazzjoni finali tal-hrER ta' 0,2 nM se tkun konformi ma' din il-kundizzjoni.

13. Jekk il-kriterju ta' 40 % ma jkunx jista' jiġi ssodisfat ripetutament, il-kompożizzjoni tal-esperiment għandha tiġi verifikata għal żbalji potenzjali. Nuqqas ta' lħuq tal-kriterju ta' 40 % jista' jindika li ftit li xejn ikun hemm riċettur attiv fil-lott rikombinanti, u mbagħad ikollu jiġi kkunsidrat l-użu ta' lott ieħor ta' riċettur.

Assaġġ tas-saturazzjoni

14. Tmien konċentrazzjonijiet li jiżdiedu dejjem aktar ta' [^{3}H]17β-estradjol għandhom jiġu evalwati fi triplikat, skont it-tliet kundizzjonijiet li ġejjin (ara t-Tabella 2):

a. Fin-nuqqas ta' 17β-estradjol mhux tikkettat u l-preżenza ta' ER. Din hi d-determinazzjoni tal-irbit totali skont il-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet li jkollhom [^{3}H]17β-estradjol biss.

b. Fil-preżenza ta' konċentrazzjoni eċċessiva għal 2000 darba ta' 17β-estradjol mhux tikkettat fuq 17β-estradjol tikkettat u fil-preżenza tal-ER. L-intenzjoni ta' din il-kundizzjoni hi li tissatura s-siti attivi tal-irbit b'17β-estradjol mhux tikkettat, u bil-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet, tiddetermina l-irbit mhux speċifiku. Kwalunkwe estradjol jaħraq li jifdal li jista' jorbot mar-riċettur jitqies li jkun jorbot ma' sit mhux speċifiku peress li l-estradjol kiesaħ għandu jkun f'konċentrazzjoni għolja tant li jintrabat mas-siti speċifiċi disponibbli kollha fuq ir-riċettur.

c. Fin-nuqqas ta' 17β-estradjol mhux tikkettat u l-assenza tal-ER (determinazzjoni tar-radjuattività totali)

Preparazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettati u tal-hrERα

15. Soluzzjoni ta' 40 nM ta' [^{3}H]-17β-estradjol għandha titħejja minn soluzzjoni ewlenija ta' 1 μM ta' [^{3}H]-17β-estradjol fid-DMSO billi jiżdiedu DMSO (biex jitħejjew 200 nM) u bafer tal-assaġġ f'temperatura ambjentali (biex jitħejjew 40 nM). Bl-użu ta' din is-soluzzjoni ta' 40 nM, titħejja s-sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' [^{3}H]-17β-estradjol, li jvarjaw minn 0,313 nM sa 40 nM b'bafer tal-assaġġ f'temperatura ambjenatli (kif rappreżentata fil-linja 12 tat-Tabella 2). Il-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ, li jvarjaw minn 0,0313 sa 4,0 nM jinkisbu billi jiżdiedu 10 μl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (ara t-Tabelli 2 u 3), Il-preparazzjoni tal-bafer tal-assaġġ, il-kalkolu tas-soluzzjoni ewlenija oriġinali ta' [^{3}H]-17β-estradjol fuq il-bażi tal-attività speċifika tagħha, il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet huma deskritti fid-dettall fil-protokoll CERI (2).

16. Id-dilwizzjonijiet ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jitħejjew minn soluzzjoni ewlenija ta' 1 nM 17β-estradjol billi jiżdied bafer tal-assaġġ biex jinkisbu tmien konċentrazzjonijiet waħda akbar mill-oħra li inizjalment ivarjaw bejn 0,625 μM u 80 μM, Il-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ, li jvarjaw minn 0,0625 sa 8 μM jinkisbu billi jiżdiedu 10 μl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra dedikata għall-kejl tal-irbit mhux speċifiku (ara t-Tabelli 2 u 3), Il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat hi deskritta fid-dettall fil-protokoll CERI (2).

▼**M8**

17. Għandha tintuża l-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti l-irbit speċifiku ta' 40±10 % (ara l-paragrafi 12-13). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha titħejja b'bafer tal-assaġġ kiesaħ silġ eżatt qabel l-użu, jiġifieri wara li jkunu thejjew il-bwejriet kollha għall-irbit totali, għall-irbit mhux speċifiku u għal-ligand jaħraq waħdu.

18. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra jitħejjew kif muri fit-Tabella 2, bi 3 repliki għal kull konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol. Assenjament tal-volum ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' 17β-estradjol mhux tikkettat, tal-bafer u tar-riċettur hu pprovdut fit-Tabella 3.

Tabella 2

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Għall-kejl tat-TB			Għall-kejl tal-NSB			Għad-determinazzjoni tal-ligand jaħraq waħdu				Dilwizzjonijiet tal-E2 mhux tikkettati għall-kolonni 4-6 tal-pjastri	Dilwizzjonijiet ta' [3H]E2 għall-kolonni 1-9 tal-pjastri
A	0,0313 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E_2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: irbit totali,
NSB: irbit mhux speċifiku
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-estradjol
E2: 17β-estradjol mhux tikkettat
(*) Il-konċentrazzjonijiet indikati hawn huma l-konċentrazzjonijiet finali f'kull bwejra.
(**) Id-dilwizzjonijiet ta' E2 u ta' [^{3}H]E2 mhux tikkettati jistgħu jithejjew fi pjastra differenti.

▼**M8**

Tabella 3

Volumi tar-Reaġent għall-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tas-Saturazzjoni

Numru tal-Linja		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Stadji tal-Preparazzjoni		Bwejriet tat-TB			Bwejriet tal-NSB			Ligand Jaħraq Waħdu		
Volum tal-komponenti għall-bwejriet ta' reazzjoni ta' fuq u l-ordni għaż-żieda	Bafer	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 mhux tikkettat mil-linja 11 fit-Tabella2	-			10 µl			-		
	[3H]E2 mil-linja12 fit-Tabella2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Volum ta' reazzjoni totali		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubazzjoni		**WARA REAZZJONI TA' INKUBAZZJONI TA' SAGHTEJN (2)**						Kwantifikazzjoni tar-radjuattività eżatt wara l-preparazzjoni. Ebda inkubazzjoni		
Trattament b'0,4 % DCC		**Iva**			**Iva**			**Nru**		
Volum ta' 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtrazzjoni		Iva			Iva			Nru		
KEJL TAD-DPMS										
Volum tal-kwantifikazzjoni miżjud mat-taħlita ta' xintillazzjoni		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Jekk tintuża LSC għall-mikropjastri għall-kejl tad-dpms, it-tħejjija tal-ligand jaħraq waħdu fl-istess pjastra tal-assaġġ tal-bwejriet tat-TB u tal-NSB ma tkunx adattata. Il-ligand jaħraq waħdu ma għandux jitħejja fi pjastra differenti.

(**) Jekk tintuża ċ-ċentrifugrazzjoni għas-separazzjoni tad-DCC, il-50 µl tas-supernatant għandhom jitkejlu bl-LSC biex tiġi evitata kontaminazzjoni tad-DCC.

19. Pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għad-determinazzjoni tal-irbit totali u tal-irbit mhux speċifiku għandhom jiġu inkubati f'temperatura ambjentali (22°C sa 28°C) għal sagħtejn.

Kejl ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα

20. Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni ta' sagħtejn, [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα għandu jiġi separat minn [^{3}H]-17β-Estradjol ħieles billi tiżdied sospensjoni ta' 100µl 0,4 % DCC kiesaħ silġ fil-bwejriet. Imbagħad il-pjastri għandhom jitqiegħdu fuq is-silġ għal 10 minuti u t-taħlita ta' reazzjoni u s-sospensjoni ta' DCC għandhom jiġu ffiltrati, bi trasferiment f'filtru tal-pjastri għall-mikrotitraġġ, biex jitneħħa d-DCC. Imbagħad għandhom jiżdiedu 100 µl tal-filtrat mal-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-kunjetti tal-LSC għad-determinazzjoni tad-disintegrazzjoni fil-minuta (dpms) għal kull kunjett bl-għadd tax-xintillazzjoni tal-likwidi.

▼M8

21. Inkella, jekk ma jkunx hemm filtru tal-mikropjastri disponibbli, it-tneħħija tad-DCC tista' tinkiseb b'ċentrifugrazzjoni. Imbagħad 50 µl supernatant li fih [^{3}H]-17β-estradjol marbut mal-hrERα għandu jittieħed b'attenzjoni estrema, biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni tal-bwejriet bil-mess tad-DCC, u għandu jintuża għall-għadd tax-xintillazzjoni.

22. Il-kundizzjoni tal-ligand jaħraq waħdu tintuża għad-determinazzjoni tad-diżintegrazzjoni fil-minuta (dpm) ta' [^{3}H]-17β-estradjol miżjud fil-bwejriet tal-assaġġ. Ir-radjuattività għandha tiġi kwantifikata eżatt wara l-preparazzjoni. Dawn il-bwejriet ma għandhomx jiġu inkubati u ma għandhomx jiġu ttrattati b'sospensjoni tad-DCC iżda l-kontenut tagħhom għandu jitwassal direttament fil-fluwidu tax-xintillazzjoni. Dawn il-miżuri juru kemm [^{3}H]-17β-estradjol f'dpms żdied ma' kull sett ta' bwejriet għall-irbit totali u għall-irbit mhux speċifiku.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

23. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [^{3}H]-17β- estradjol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw tliet repliki konkorrenti f'kull konċentrazzjoni fi ħdan sessjoni waħda. Barra minn hekk, għandhom isiru tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għal kull sustanza kimika ttestjata. L-assaġġ għandu jsir fi pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra.

Kontrolli

24. Meta jsir l-assaġġ, is-solvent u l-kontrolli konkorrenti (jiġifieri l-estroġenu referenzjarju, il-legant dgħajjef, u dak mhux legant) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Kurvi sħaħ ta' konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dgħajjef u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu, jiġifieri bejn wieħed u ieħor spostament sħiħ tal-ligand radjotikkettat) u medja (bejn wieħed u ieħor l-IC_{50}) ta' E2 u ta' legant dgħajjef fi triplikat; (ii) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, kull wieħed fi triplikat. Il-proċeduri għat-tħejjija tal-bafer tal-assaġġ, ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' hrERα u tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma deskritti fil-fond fil-protokoll CERI (2).

Kontrolli tas-solvent:

25. Il-kontroll b'solvent jindika li s-solvent ma jinteraġixxix mas-sistema tat-test u jkejjel ukoll l-irbit totali (TB). DMSO hu s-solvent preferut. Inkella, jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fid-DMSO, jista' jintuża l-etanol. Il-konċentrazzjoni tad-DMSO fil-bwejriet tal-assaġġ finali għandha tkun ta' 2,05 % u tista' tiżdied sa 2,5 % fil-każ ta' nuqqas ta' solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test. Konċentrazzjonijiet ta' DMSO ogħla minn 2,5 % ma għandhomx jintużaw minħabba l-interferenza ta' konċentrazzjonijiet ogħla tas-solvent mal-assaġġ. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jkunux solubbli fid-DMSO, iżda solubbli fl-etanol, jista' jintuża massimu ta' 2 % etanol fl-assaġġ mingħajr interferenza.

Kontroll bil-bafer:

26. Il-kontroll bil-bafer (BC) la għandu jkun fih solvent u lanqas is-sustanza kimika tat-test, iżda għandu jkun fih il-komponenti l-oħra kollha tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bil-bafer jitqabblu mal-kontroll b'solvent biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ.

▼M8

Legant b'saħħtu (estroġenu ta' riferiment)

27. 17β-estradjol (CAS 50-28-2) hu l-ligand endoġenu u jorbot b'affinità għolja mal-ER, subtip tal-alfa. Kurva standard li tuża 17β-estradjol mhux tikkettat għandha titħejja għal kull assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrERα, biex tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien fi ħdan l-istess laboratorju. Tmien soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jitħejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejriet tal-assaġġ li għandhom jintużaw għall-kurva standard imqassma kif ġej: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. L–ogħla konċentrazzjoni ta' 17β–estradjol (1 μM) mhux tikkettat għandha sservi bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku. Din il-konċentrazzjoni hi distinta bit-tikketta "NSB" fit-Tabella 4 għalkemm hi wkoll parti mill-kurva standard.

Legant dgħajjef

28. Legant dgħajjef (noretinodrel (CAS68-23-5), jew inkella, noretindron (CAS 68-22-4)) għandu jkun inkluż biex tintwera s-sensittività ta' kull esperiment u tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien. Tmien soluzzjonijiet tal-legant dgħajjef għandhom jitħejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejriet tal-assaġġ kif ġej: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} u 10^{-9} M.

Mhux legant

29. L-ottitrietossisilan (OTES, CAS 2943-75-1) għandu jintuża bħala l-kontroll negattiv (mhux legant). Dan jipprovdi garanzija li l-assaġġ kif imwettaq isib sustanzi kimiċi tat-test li ma jorbtux mal-hrERα. Tmien soluzzjonijiet tal-mhux legant għandhom jitħejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejriet tal-assaġġ kif ġej: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Il–ftalat tad–di–n–butil (DBP, CAS 84-72-2) jista' jintuża bħala mhux legant alternattiv, iżda jiġi ttestjat sa 10^{-4}M biss. Is-solubbiltà massima ta' DBP fl-assaġġ intweriet li hi 10^{-4}M.

Konċentrazzjoni tal-hrERα

30. Għandu jintuża l-ammont tar-riċettur li jagħti l-irbit speċifiku ta' 40±10 % (ara l-paragrafi 12-13 tal-Appendiċi 3). Is-soluzzjoni ta' hrERα għandha titħejja b'dilwizzjoni tal-hrERα funzjonali f'bafer tal-assaġġ kiesaħ silġ, eżatt qabel l-użu.

[^{3}H]-17β-estradjol

31. Il-konċentrazzjoni finali ta' [^{3}H]-17β-estradjol fil-bwejriet tal-assaġġ għandha tkun ta' 0,5 nM.

Sustanzi Kimiċi tat-Test

32. L-ewwel nett, hemm bżonn li jsir test tas-solubbiltà biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir il-protokoll tat-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u mbagħad jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jinkludi kontroll b'solvent flimkien ma' tal-anqas tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdew bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat (ara wkoll il-paragrafu 35 tal-Appendiċi 3). Ladarba tiġi

▼M8

determinata l-medda ta' konċentrazzjonijiet, sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata bl-użu ta' tmien konċentrazzjonijiet tal-log spazjati kif xieraq kif definit fit-test preċedenti tas-sejbien tal-medda. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati ulterjorment kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons, jekk ikun hemm bżonn.

33. Id-dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jitħejjew fis-solvent xieraq (ara l-paragrafu 25 tal-Appendiċi 3). Jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fid-DMSO jew fl-etanol, u ż-żieda ta' aktar solvent tkun tirriżulta f'konċentrazzjoni tas-solvent ogħla mil-limitu aċċettabbli fit-tubu finali, l-ogħla konċentrazzjoni tista' titnaqqas għall-anqas konċentrazzjoni li jmiss. F'dan il-każ, konċentrazzjoni addizzjonali tista' tiżdied fil-limitu inferjuri tas-serje ta' konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet oħra fis-serje għandhom jibqgħu l-istess.

34. Is-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ssorveljati bir-reqqa meta jiżdiedu mal-bwejra tal-assaġġ, peress li s-sustanza kimika tat-test tista' tfur barra maż-żieda fil-bwejra tal-assaġġ. Id-*data* għall-bwejriet kollha li fihom il-preċipitat għandha tkun eskluża mid-dħul ta' kurva, u r-raġuni għall-esklużjoni tad-*data* għandha tiġi nnotata.

35. Jekk hemm informazzjoni eżistenti preċedenti minn sorsi oħra li jipprovdu log(IC_{50}) ta' sustanza kimika tat-test, jista' jkun xieraq li d-dilwizzjonijiet jitqassmu ġeometrikament aktar qrib tal-log(IC_{50}) mistenni (jiġifieri 0,5 unitajiet tal-log). Ir-riżultati finali għandhom juru biżżejjed tifrix tal-konċentrazzjonijiet fuq iż-żewġ naħat tal-log(IC50), inkluži l-"qoċċata" u l-"qiegħ", b'tali mod li l-kurva tal-irbit tkun tista' tiġi karatterizzata b'mod adegwat.

Organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ

36. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tikkettatti għandhom jitħejjew bl-użu ta' inkubazzjonijiet sestupli għall-kontroll b'solvent, bl-ogħla konċentrazzjoni tal-estroġenu referenzjarju (E2) li sservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku (NSB), bil-kontroll b'bafer, u inkubazzjonijiet triplikati għal kull waħda mit-tmien konċentrazzjonijiet tal-kontroll li ma jorbotx (ottiltrietossisilan), bis-seba' konċentrazzjonijiet inferjuri għall-estroġenu referenzjarju (E2), bit-tmien konċentrazzjonijiet tal-legant dgħajjef (noretinodrel jew noretindron), u bit-tmien konċentrazzjonijiet ta' kull sustanza kimika tat-test (TC). Tifsila indikattiva tad-dijagramma tat-tifsila tal-pjastra għall-kurvi sħaħ tal-konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontrolli referenzjarji hi mogħtija hawn taħt fit-Tabella 4. Jintużaw pjastri addizzjonali għall-mikrotitraġġ għas-sustanza kimika tat-test u dawn għandu jkun fihom kontrolli tal-pjastra (jiġifieri (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (madwar l-IC_{50}) ta' E2 u legant dgħajjef fi triplikat; ii) kontroll b'solvent (bħala rbit totali) u irbit mhux speċifiku, kull wieħed f'sestuplu (Tabella 5). Eżempju ta' worksheet tat-tifsila tal-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ kompetittiv bl-użu ta' tliet sustanzi kimiċi tat-test mhux magħrufa hu pprovdut fl-Appendiċi 3.3. Il-konċentrazzjonijiet indikati fil-worksheet kif ukoll fit-Tabelli 4 u 5 jirreferu għall-konċentrazzjonijiet finali użati f'kull bwejra tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni massima għall-E2 għandha tkun ta' 1×10^{-7} M u għal-legant dgħajjef għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni użata għal-legant dgħajjef fil-pjastra 1. Il-konċentrazzjoni tal-IC_{50} trid tiġi determinata mil-laboratorju fuq il-bażi tal-bażi ta' *data* tal-kontroll storiku tiegħu. L-aspettattia hi li dan il-valur ikun simili għal dak osservat fl-istudji ta' validazzjoni (ara t-tabella 1).

▼M8

Tabella 4

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ [1], [2] **tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Kurvi Sħaħ ta' Konċentrazzjoni għal Estroġenu u għal Kontrolli Referenzjarji (Pjastra 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontroll bil-Bafer u Kontroll Pożittiv (E2)			Pożittiv Dgħajjef (Noretinodrel)			Kontroll Negattiv (OTES)			TB u NSB		
A	Inbjank (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontroll b'solvent) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontroll bil–bafer		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Inbjank (għal dak jaħraq) (*)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Kampjun stabbilit għall-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-istandards li għandu jitħaddem ma' kull esperiment.
([2]) Kun af li din il-pjastra għall-mikrotitraġġ issir bl-użu tad-dilwizzjonijiet magħmula fil-pjastra tad-dilwizzjoni deskritta għall-istandards fit-taqsimiet preċedenti.
F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)
(*) inbjank veru, bwejra mhux użata
(**) inbjank mhux użat matul l-inkubazzjoni, iżda użat biex tiġi kkonfermata r-radjuattività totali miżjuda.

Tabella 5

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Pjastri Addizzjonali għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test (TC) u għall-Kontrolli tal-Pjastri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Sustanza Kimika tat-Test-1 (TC-1)			Sustanza Kimika tat-Test-2 (TC-2)			Sustanza Kimika tat-Test-3 (TC-3)			Kontrolli		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10_{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (Kontroll b'solvent)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)

▼M8

Tlestija tal-assaġġ tal-irbit kompetittiv

37. Bwejriet tal-eċċezzjonar għall-irbit totali u inbjanki (għall-jaħarqu), kif murija fit-Tabella 6, 50 µl tal-bafer tal-assaġġ għandhom jitqiegħdu f'kull bwejra, u għandhom jitħalltu ma' 10 µl kontroll b'solvent, estroġenu referenzjarju (E2), legant dgħajjef, mhux legant, u sustanzi kimiċi tat-test, rispettivament, 10 µl ta' soluzzjoni ta' 5 nM [3H]-17β-estradjol. Imbagħad, soluzzjoni ta' 30µl riċettur kiesaħ silġ iddaħħlet f'kull pjastra u tħalltet bil-galbu. Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha tkun l-aħħar reaġent miżjud. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'temperatura ambjentali (22° sa 28°C) għal sagħtejn (2).

Tabella 6

Volum tal-Komponenti tal-Assaġġ għall-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv tal-hrER, Pjastri għall-Mikrotitraġġ

Stadji tal-Preparazzjoni		Għajr bwejriet tat-TB	Bwejriet tat-TB	Inbjank (għal dak jaħraq)
Volum tal-komponenti għall-bwejriet ta' reazzjoni ta' fuq u l-ordni għażżieda	Bafer tal-assaġġ f'Temperatura Ambjentali	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 mhux tikkettat, legant dgħajjef, mhux legant, solvent u sustanzi kimiċi tat-test (*)	10 µl	-	-
	[3H]-17β-estradjol għall-kisba tal-konċentrazzjoni finali ta' 0,5 nM (jiġifieri 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	konċentrazzjoni tal-rERα kif determinata (ara l-paragrafi 12-13)	30 µl	30 µl	-
Volum totali f'kull bwejra tal-assaġġ		100 µl	100 µl	100 µl

(*) imħejjija kif xieraq biex tinkiseb konċentrazzjoni finali fi ħdan il-konċentrazzjoni aċċettabbli tas-solvent

38. Imbagħad għandha ssir il-kwantifikazzjoni ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα, wara separazzjoni ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα minn [^{3}H]-17β-Estradjol ħieles billi tiżdied sospensjoni ta' 100 µl DCC kiesaħ silġ f'kull bwejra, kif deskritt fil-paragrafi 21-23 tal-Appendiċi 3 għall-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.

39. Il-bwejriet G10-12 u H10-12 (identifikati bħala inbjank (għal dawk jaħarqu) fit-Tabella 4) jirrappreżentaw id-dpms tal-estradjol tikkettat [^{3}H] f'10 µl. L-alikwota ta' 10 µl għandha titwassal direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni.

Kriterji ta' aċċettabbiltà

Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

40. Il-kurva tal-irbit speċifiku għandha tilħaq plateau hekk kif jintużaw konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [^{3}H]-17β-estradjol, li tindika saturazzjoni tal-hrERα bil-ligand.

41. Il-ligand speċifiku f'0,5 nM [^{3}H]-17β-estradjol għandu jkun ġewwa l-medda aċċettabbli ta' 30 % sa 50 % tar-radjuattività totali mkejla medja miżjuda fis-sessjonijiet. Ħruġ ħafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata u l-assaġġ tas-saturazzjoni għandu jerġa' jsir.

▼**M8**

42. Id-*data* għandha tipproduċi plott Scatchard lineari.

43. L-irbit mhux speċifiku ma għandux ikun eċċessiv. Il-valur għall-irbit mhux speċifiku tipikament għandu jkun ta' <35 % tal-irbit totali. Madankollu, il-proporzjon jista' kultant jaqbeż dan il-limitu meta titkejjel dpm baxxa ħafna għall-anqas konċentrazzjoni ta' 17β-estradjol radjotikkettat ittestjat.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

44. Konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jispostaw [^{3}H]-17β-estradjol mir-riċettur b'mod konsistenti b'irbit kompetittiv f'sit wieħed.

45. Il-valur tal-IC_{50} għall-estroġenu ta' riferiment (jiġifieri 17β-estradjol) għandu jkun bejn wieħed u ieħor daqs il-konċentrazzjoni molari ta' [^{3}H]-17β-estradjol flimkien ma' Kd determinat mill-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.

46. L-irbit speċifiku totali għandu jkun konsistentement fi ħdan il-medda aċċettabbli ta' 40 ± 10 % meta l-konċentrazzjoni mkejla medja tar-radjuattività totali miżjuda f'kull bwejra tkun ta' 0,5 nM fis-sessjonijiet. Ħruġ ħafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata.

47. Is-solvent ma għandux ibiddel is-sensittività jew ir-riproduċibbiltà tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bis-solvent (bwejriet tat-TB) jitqabblu mal-kontroll bil-bafer biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ. Ir-riżultati tat-TB u tal-kontroll bil-Bafer għandhom ikunu komparabbli jekk ma jkun hemm ebda effett tas-solvent fuq l-assaġġ.

48. Il-mhux legant ma għandux jisposta aktar minn 25 % tal-[^{3}H]-17β-estradjol mill-hrERα meta jiġi ttestjat sa 10^{-3} M (OTES) jew 10^{-4} M (DBP).

49. Il-kriterji tal-prestazzjoni ġew żviluppati għall-estroġenu ta' referenza u għal żewġ leganti dgħajfin (eż. noretinodrel, noretindron) bl-użu tad-*data* mill-istudju ta' validazzjoni għall-Assaġġ CERI tal-Irbit tal-hrER (Anness N ta' riferiment 2). L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti għal ± SD (n) tas-sessjonijiet tal-kontroll kollha bejn erba' laboratorji li ħadu sehem fl-istudju ta' validazzjoni. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % ġew ikkalkolati għall-parametri ta' dħul ta' kurva (jiġifieri l-quċċata, il-qiegħ, Hillslope u Log IC_{50}) għall-estroġenu referenzjarju u għal-leganti dgħajfin, għal-Log_{10}RBA tal-leganti dgħajfin relattivi għall-estroġenu referenzjarju. It-Tabella 1 tipprovdi l-meded mistennija għall-parametri ta' dħul ta' kurva li jistgħu jintużaw bħala kriterji tal-prestazzjoni. Fil-prattika, il-medda tal-IC_{50} tista' tvarja ftit fuq il-bażi tal-Kd derivat minn esperimenti tal-preparazzjoni tar-riċettur u tal-konċentrazzjoni tal-ligand użati għall-assaġġ.

50. Ma ġie żviluppat ebda kriterju tal-prestazzjoni għall-parametri ta' dħul ta' kurva għas-sustanzi kimiċi tat-test minħabba l-firxa vasta ta' sustanzi kimiċi tat-test potenzjali eżistenti u l-varjazzjoni fl-affinitajiet u fl-eżiti potenzjali (eż. Kurva sħiħa, kurva parzjali, ebda dħul ta' kurva). Madankollu, għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati minn kull

▼M8

sessjoni għal kull sustanza kimika tat-test. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċċata (eż. 90 - 100 % tal-irbit) tal-kurva kompetittiva. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-kontrolli minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għandhom joqorbu lejn il-kejlijiet tal-prestazzjoni rrapportati għal dan l-assaġġ CERI u jkunu konsistenti mad-*data* storika tal-kontrolli minn kull laboratorju rispettiv.

ANALIŻI TAD-*DATA*

Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

51. Jitkejjel l-irbit totali kif ukoll dak mhux speċifiku. Minn dawn il-valuri, l-irbit speċifiku tal-konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [^{3}H]-17β-estradjol f'kundizzjonijiet ta' ekwilibriju jiġi kkalkolat bit-tnaqqis tal-mhux speċifiku mit-total. Graff tal-irbit speċifiku kontra l-konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol għandha tilħaq plateau għall-irbit speċifiku massimu li tindika saturazzjoni tal-hrERα bl-[^{3}H]-17β-estradjol. Barra minn hekk, l-analiżi tad-*data* għandha tiddokumenta l-irbit ta' [^{3}H]-17β- estradjol ma' sit ta' rbit wieħed b'affinità għolja. L-irbit mhux speċifiku, totali u speċifiku għandu jintwera fuq kurva tal-irbit tas-saturazzjoni. Analiżi ulterjuri ta' din id-*data* għandha tuża analiżi ta' rigressjoni mhux lineari (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) b'wiri finali tad-*data* bħala plot Scatchard.

52. L-analiżi tad-*data* għandha tiddetermina l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit totali biss, bl-użu tas-suppożizzjoni li l-irbit mhux speċifiku hu lineari, sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għall-użu ta' metodu differenti. Barra minn hekk, ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Il-korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. bl-użu tal-metodu ta' Swillens 1995) dejjem għandha tintuża meta jiġu determinati l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

53. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tiġi plottjata bħala irbit speċifiku ta' [^{3}H]-17β-estradjol kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log10) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta' [^{3}H]-17β hi l-valur tal-IC_{50}.

54. Stimi tal-valuri tal-log (IC_{50}) għall-kontrolli pożittivi (eż. estroġenu referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Il-quċċata, il-qiegħ, il-pendil u l-log(IC_{50}) ġeneralment għandhom jitħallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Ma għandhiex tintuża korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tiġi rieżaminata biex jiġi żgurat dħul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef għandha tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC_{50}) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC_{50}) għal 17β-estradjol. Ir-riżultati mill-kontrolli pożittivi u mill-kontroll mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-miżuri tal-prestazzjoni tal-assaġġ fil-paragrafi 44-49 ta' dan l-Appendiċi 3.

▼M8

55. Id-*data* għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tiġi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tiġi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tiġi klassifikata kif suppost. Hu rakkomandat li kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel issirilha analiżi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estroġenu referenzjarju u għall-kontrolli tal-legant dgħajjef (ara l-paragrafu 54 ta' dan l-Appendiċi 3). Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dħul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidħol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv ġenerata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta' tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [^{3}H]-17β-estradjol marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, u l-konsistenza fil-parametri mdaħħla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analiżijiet tad-*data* saru kif suppost.

Interpretazzjoni tad-*data*

56. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà, sustanza kimika tat-test titqies li tkun legant għall-hrERα jekk kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons fi ħdan il-medda tad-*data* jkun anqas minn 50 % (Figura 1).

57. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li mhix legant għall-hrERα jekk:

— Kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi ħdan il-medda tad-*data* jkun ogħla minn 75 %, jew

— Kurva tal-irbit ma tkunx tista' tiddaħħal u l-anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* jkun ogħla minn 75 %.

58. Is-sustanzi kimiċi tat-test jitqiesu ekwivoċi jekk ma tiġi ssodisfata l-ebda waħda mill-kundizzjonijiet ta' hawn fuq (eż. l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla jkun bejn 76 – 51 %).

Tabella 7

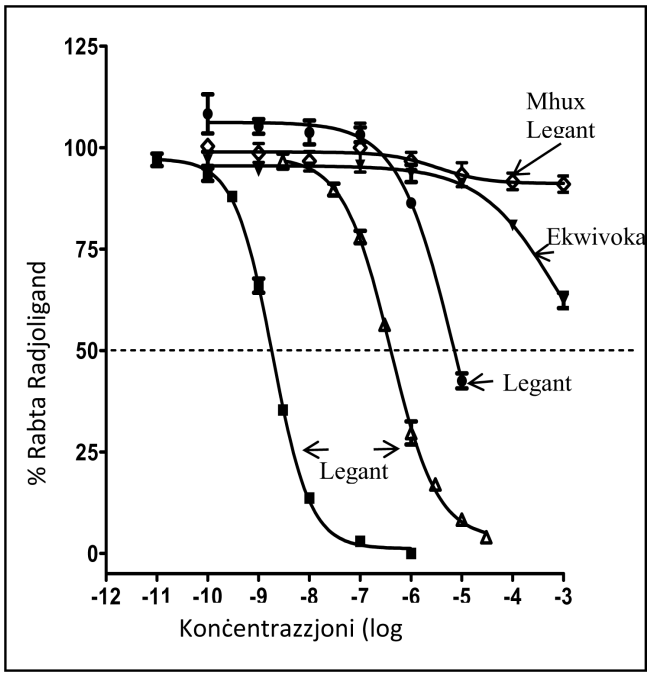
Kriterji għall-assenjazzjoni tal-klassifikazzjoni fuq il-bażi tal-kurva tal-irbit kompetittiv għal sustanza kimika tat-test.

Klassifikazzjoni	Kriterji
Legant[a]	Kurva tal-irbit tista' tiddaħħal. L-**anqas punt fil-kurva tar-rispons fi ħdan il-medda tad-*data* hu anqas minn 50 %.**
Mhux Legant[b]	Jekk tista' tiddaħħal kurva tal-irbit, l-**anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi ħdan il-medda tad-*data* hu akbar minn 75 %.** Jekk ma tistax tiddaħħal kurva tal-irbit, l-**anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* hu ogħla minn 75 %.**
Ekwivoċi[c]	Kwalunkwe sessjoni li tista' tiġi ttestjata la hi legant u lanqas mhux legant (*eż.* L-anqas punt fil-kurva mdaħħla tar-rspons hu bejn 76 – 51 %).

▼M8

Figura 1

Eżempji ta' klassifikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test bl-użu ta' kurva tal-irbit kompetittiv.



59. Diversi sessjonijiet imwettqa fi ħdan laboratorju għal sustanza kimika tat-test jiġu kombinati bl-assenjazzjoni ta' valuri numeriċi għal kull sessjoni u bit-teħid tal-medja bejn is-sessjonijiet kif muri fit-Tabella 8. Ir-riżultati għas-sessjonijiet kombinati fi ħdan kull laboratorju jitqabblu mal-klassifikazzjoni mistennija għal kull sustanza kimika tat-test.

Tabella 8

Il-metodu għall-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bl-użu ta' diversi sessjonijiet fi ħdan laboratorju

Biex jiġi assenjat valur għal kull sessjoni:	
Klassifikazzjoni	**Valur Numeriku**
Legant	2
Ekwivoċi	1
Mhux legant	0

Biex tiġi klassifikata medja ta' valur numeriku fuq diversi sessjonijiet:	
Klassifikazzjoni	**Valur Numeriku**
Legant	Medja ≥ 1,5
Ekwivoċi	0,5 ≤ Medja < 1,5
Mhux legant	Medja < 0,5

RAPPORT TAT-TEST

60. Ara l-paragrafu 24 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER" ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼**M8**

Appendiċi 3.1

LISTA TA' TERMINI

[^{3}H]E2: 17β-Estradjol radjotikkettat bi tritju

DCC: Faħam miksi bid-dekstran

E_2: 17β-estradjol mhux tikkettat (inert)

Bafer tal-assaġġ: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, li fih 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % Gliċerol, 0,2 mM Lewpeptina, 1 mM Ditjotreitol u 10 mg/ml Albumina tas-Serum tal-Bovini

hrERα: Riċettur alfa tal-estroġenu rikombinanti uman (dominju li jorbot tal-ligand)

Replika: Waħda mid-diversi bwejriet li jkun fihom l-istess kontenut fl-istess konċentrazzjonijiet u li jiġu ttestjati b'mod konkorrenti fi ħdan sessjoni waħda. F'dan il-protokoll, kull konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata fi triplikat; jiġifieri, hemm tliet repliki li jiġu assaġġati fl-istess ħin f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Sessjoni: Sett sħiħ ta' bwejriet ta' assaġġ ta' pjastra għall-mikrotitraġġ f'sessjoni konkorrenti li jipprovdi l-informazzjoni neċessarja kollha biex jiġi karatterizzat l-irbit ta' sustanza kimika tat-test mal-hrERα (viz., it-total [^{3}H]-17β-estradjol miżjud fil-bwejra tal-assaġġ, l-irbit massimu ta' [^{3}H]-17β-estradjol mal-hrERα, l-irbit mhux speċifiku, u l-irbit totali f'diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test). Sessjoni tista' tikkonsisti fi bwejra tal-assaġġ waħda biss (jiġifieri replika) għal kull konċentrazzjoni, iżda peress li dan il-protokoll jeħtieġ assaġġar fi triplikat, sessjoni waħda tikkonsist fi tliet bwejriet tal-assaġġ għal kull konċentrazzjoni. Barra minn hekk, dan il-protokoll jeħtieġ tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri mhux konkorrenti) għal kull sustanza kimika.

▼**M8**

Appendiċi 3.2

TIFSILA TAL-BWEJRIET TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT KOMPETITTIV

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	A1	1	Inbjank	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Inbjank	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Inbjank	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 kiesaħ	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	E2 kiesaħ	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	E2 kiesaħ	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	E2 kiesaħ	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	E2 kiesaħ	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	E2 kiesaħ	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	E2 kiesaħ	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	E2 kiesaħ	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	E2 kiesaħ	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	E2 kiesaħ	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	E2 kiesaħ	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	E2 kiesaħ	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	E2 kiesaħ	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	E2 kiesaħ	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	E2 kiesaħ	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	E2 kiesaħ	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	G2	2	E2 kiesaħ	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	E2 kiesaħ	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	E2 kiesaħ	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	E2 kiesaħ	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	E2 kiesaħ	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	L	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	L	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	L	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	L	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	L	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	L	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	L	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	L	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	L	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	L	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	L	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	L	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	L	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	L	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	L	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	F7	1	OTES	L	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	L	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	L	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	L	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	L	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	L	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	L	OTES8DBP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	L	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	L	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	irbit totali	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	irbit totali	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	irbit totali	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	irbit totali	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	irbit totali	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	irbit totali	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jaħraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	D12	6	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Kontroll bil-bafer	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Kontroll bil—bafer	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Kontroll bil—bafer	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Kontroll bil—bafer	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Kontroll bil—bafer	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Kontroll bil—bafer	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħraq	H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħraq	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħraq	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħraq	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jaħraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	H11 (*)	5	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħraq	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħraq	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Mhux magħruf 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Mhux magħruf 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Mhux magħruf 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Mhux magħruf 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Mhux magħruf 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Mhux magħruf 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Mhux magħruf 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Mhux magħruf 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Mhux magħruf 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Mhux magħruf 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Mhux magħruf 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Mhux magħruf 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Mhux magħruf 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Mhux magħruf 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Mhux magħruf 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Mhux magħruf 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Mhux magħruf 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Mhux magħruf 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Mhux magħruf 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Mhux magħruf 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Mhux magħruf 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Mhux magħruf 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Mhux magħruf 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	H3	3	Mhux magħruf 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Mhux magħruf 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Mhux magħruf 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Mhux magħruf 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Mhux magħruf 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Mhux magħruf 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Mhux magħruf 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Mhux magħruf 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Mhux magħruf 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Mhux magħruf 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Mhux magħruf 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Mhux magħruf 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Mhux magħruf 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Mhux magħruf 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Mhux magħruf 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Mhux magħruf 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Mhux magħruf 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Mhux magħruf 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Mhux magħruf 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Mhux magħruf 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Mhux magħruf 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Mhux magħruf 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Mhux magħruf 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Mhux magħruf 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Mhux magħruf 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Mhux magħruf 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Mhux magħruf 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	A9	3	Mhux magħruf 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Mhux magħruf 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Mhux magħruf 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Mhux magħruf 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Mhux magħruf 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Mhux magħruf 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Mhux magħruf 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Mhux magħruf 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Mhux magħruf 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Mhux magħruf 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Mhux magħruf 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Mhux magħruf 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Mhux magħruf 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Mhux magħruf 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Mhux magħruf 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Mhux magħruf 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Mhux magħruf 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Mhux magħruf 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Mhux magħruf 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Mhux magħruf 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Mhux magħruf 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Mhux magħruf 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	E2 tal-Kontroll (mass)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	E2 tal-Kontroll (mass)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	E2 tal-Kontroll (mass)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	E2 tal-Kontroll (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	B11	2	E2 tal-Kontroll (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	E2 tal-Kontroll (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	NE tal-Kontroll (mass)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	NE tal-Kontroll (mass)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	NE tal-Kontroll (mass)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	NE tal-Kontroll (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	NE tal-Kontroll (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	NE tal-Kontroll (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	irbit totali	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	irbit totali	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	irbit totali	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-

▼**M8**

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	H10	4	irbit totali	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	irbit totali	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	irbit totali	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

(*) Kun af li l-bwejriet "jaħarqu" jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-10 µl jiżdiedu biss għall-għadd tax-xintillazzjoni.

▼**M8**

Appendiċi 4

KUNSIDERAZZJONIJIET GĦALL-ANALIŻI TAD-*DATA* MILL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT KOMPETITTIV TAL-HRER

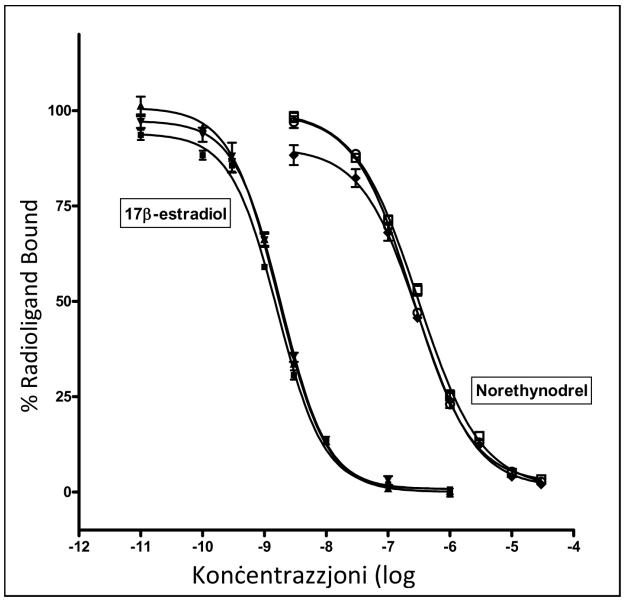
1. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrERα jkejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [^{3}H]-17β- estradjol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tiġi plottjata bħala irbit speċifiku ta' [^{3}H]-17β-estradjol kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log10) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta' [^{3}H]-17β hi l-IC_{50}.

Analiżi tad-*Data* għall-Estroġenu Referenzjarju u għal-Legant Dgħajjef (1)

2. Id-*data* mis-sessjonijiet tal-kontroll huma trasferomati (jiġifieri l-irbit speċifiku perċentwali ta' [^{3}H]-17β-estradjol u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tal-kontroll) għall-analiżi ulterjuri. Stimi tal-valuri tal-log (IC_{50}) għall-kontrolli pożittivi (eż. estroġenu referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Il-quċċata, il-qiegħ, il-pendil u l-log(IC50) tipikament jistgħu jitħallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand ma kinitx meħtieġa għall-assaġġi tal-hrER FW jew CERI, iżda tista' tiġi kkunsidrata jekk tkun meħtieġa. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tiġi riežaminata biex jiġi żgurat dħul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef tista' tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC_{50}) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC_{50}) għal 17β-estradjol. Ir-riżultati għall-kontrolli pożittivi u għall-kontroll tal-mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-kejlijiet tal-prestazzjoni tal-assaġġ u tal-kriterji ta' aċċettabbiltà kif deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar (paragrafu 20), fl-Appendiċi 2 (Assaġġ FW, paragrafi 41-51) u fl-Apendiċi 3 (Assaġġ CERI, paragrafi 41-51). Eżempji ta' tliet sessjonijiet għall-estroġenu referenzjarju u għal-legant dgħajjef huma murija fil-Figura 1.

Figura 1

Eżempji tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għall-estroġenu referenzjarju u għal-legant dgħajjef tal-kontroll.



▼**M8**

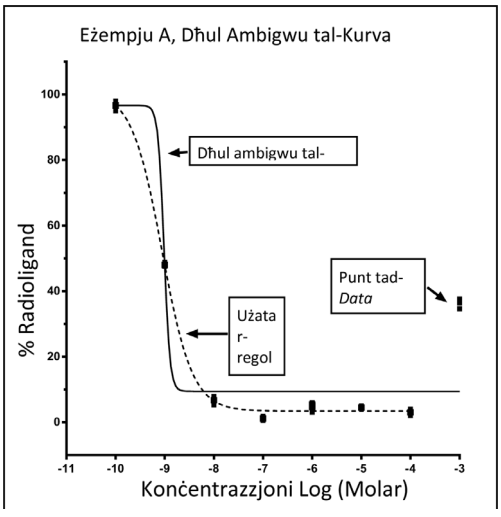
Analiżi tad-*Data* għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

3. Id-*data* għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tiġi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tiġi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tiġi klassifikata kif suppost. Kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel għandha ssirilha analiżi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estroġenu referenzjarju u għall-kontrolli tal-legant dgħajjef. Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dħul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidħol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv ġenerata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta' tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [^{3}H]-17β-estradjol marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni kimika, u l-konsistenza fil-parametri mdaħħla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analiżijiet tad-*data* saru kif suppost. Għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test, u d-*data* użata biex kull sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata bħala legant jew mhux legant għandha tkun xjentifikament difendibbli.

4. Kultant jista' jkun hemm eżempji ta' *data* li teħtieġ attenzjoni addizzjonali biex tkun tista' tiġi analizzata u interpretata kif xieraq id-*data* dwar l-irbit tal-hrER. Studji fil-passat kienu urew każijiet li fihom l-analiżi u l-interpretazzjoni tad-*data* dwar l-irbit tar-riċettur kompetittiv jistgħu jkunu kumplikati minħabba rpiljar tal-irbit speċifiku perċentwali meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi fl-ogħla konċentrazzjonijiet (Figura 2). Din hi problema magħrufa sew li nstabet meta ntużaw protokolli għal numru ta' assaġġi tal-irbit tar-riċettur kompetittiv (3). F'dawn il-każijiet, jiġi osservat rispons dipendenti fuq il-konċentrazzjoni f'konċentrazzjonijiet inferjuri, iżda hekk kif il-konċentrazzjoni tal-approċċi tas-sustanza kimika tat-test toqrob lejn il-limitu tas-solubbiltà, l-ispostament ta' [^{3}H]17β-estradjol ma jkomplix jonqos. F'dawn il-każijiet, id-*data* għall-konċentrazzjonijiet ogħla tindika li ntlaħaq il-limitu bijoloġiku tal-assaġġ. Pereżempju, dan il-fenomenu ħafna drabi jiġi assoċjati mal-insolubbiltà kimika u mal-preċipitazzjoni f'konċentrazzjonijiet għoljin, jew jista' jkun ukoll riflessjoni ta' qbiż tal-kapaċità tal-faħam miksi bid-dekstran biex jinqabad il-ligand radjotikkettat mhux marbut matul il-proċedura ta' separazzjoni fl-ogħla konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika. L-inklużjoni ta' dawn il-punti tad-*data* meta tiddaħħal id-*data* dwar l-irbit kompetittiv f'kurva sigmojde kultant tista' twassal għal klassifikazzjoni ħażina tal-potenzjal ta' rbit tal-ER għal sustanza kimika tat-test (Figura 2). Biex dan jiġi evitat, il-protokoll għall-assaġġi tal-irbit tal-hrER FW u CERI jinkludi għażla li mill-analiżijiet jiġu eskluži punti tad-*data* fejn il-medja tar-repliki għall-irbit speċifiku perċentwali ta' [^{3}H]17β-estradjol tkun 10 % jew aktar ogħla mill-medja osservata f'konċentrazzjoni inferjuri (jiġifieri dik li komunement tissejjaħ ir-regola tal-10 %). Din ir-regola tista' tintuża darba biss għal kurva partikolari, u jrid ikun jifdal *data* għal tal-anqas sitt konċentrazzjonijiet b'tali mod li tkun tista' tiġi klassifikata kif suppost il-kurva.

Figura 2

Eżempji, Kurvi tal-Irbit Kompetittiv bl-Użu tar-Regola tal-10 % u mingħajr.

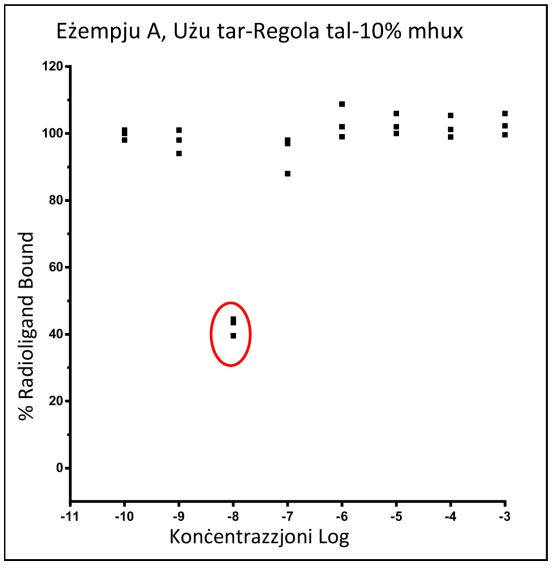


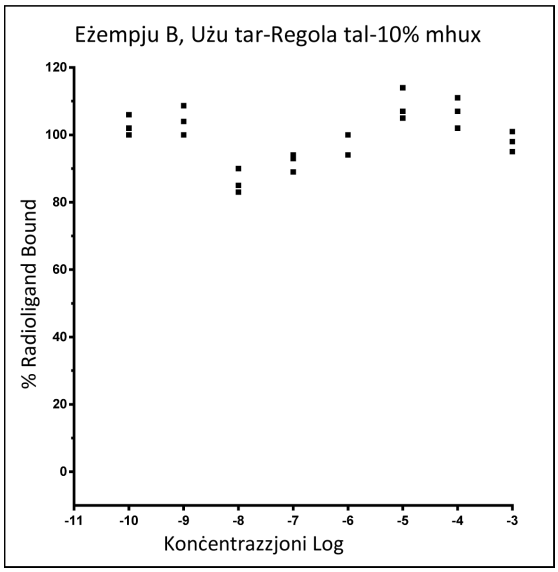
▼M8

5. L-użu xieraq tar-regola tal-10 % għall-korrezzjoni ta' dawn il-kurvi għandu jiġi kkunsidrat bil-galbu u riżervat għal dawk il-każijiet li fihom ikun hemm indikazzjoni b'saħħitha ta' legant tal-hrER. Matul it-twettiq tal-esperimenti għall-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ tal-Irbit tal-hrER FW, ġie osservat li r-regola tal-10 % kultant kellha konsegwenza mhux intenzjonata u imprevista. Is-sustanzi kimiċi li ma interaġixxux mar-riċettur (jiġifieri mhux leganti veri) spiss urew varjabbiltà madwar l-irbit tar-radjoligandi ta' 100 % li kienet aktar minn 10 % fil-medda ta' konċentrazzjonijiet ittestjati. Jekk l-anqas valur inzerta kien f'konċentrazzjoni baxxa, id-*data* mill-konċentrazzjonijiet ogħla kollha potenzjalment setgħet titħassar mill-analiżi bl-użu tar-regola tal-10 %, għalkemm dawk il-konċentrazzjonijiet jistgħu jkunu siewja fl-istabbiliment tal-fatt li s-sustanza kimika mhix legant. Il-Figura 3 turi eżempji li fihom l-użu tar-regola tal-10 % ma tkunx adattata.

Figura 3

Eżempji, *Data* dwar l-Irbit Kompetittiv Fejn l-Użu tar-Regola tal-10 % Ma Jkunx Adattat.





▼**M8**

REFERENZI

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) Motulsky H. u Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/-manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

B.71 ASSAĠĠI *IN VITRO* DWAR IS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA LI JINDIRIZZA L-AVVENIMENT EWLIENI FL-ATTIVAZZJONI TAĊ-ĊELLOLI DENDRITIĊI FUQ IL-PERKORS TAL-EŻITU AVVERS (AOP) GĦAS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA

INTRODUZZJONI ĠENERALI

Attivazzjoni tal-metodu ta' ttestjar ibbażat fuq l-avveniment ewlieni taċ-ċelloli dendritiċi

1. Sentizzatur tal-ġilda jirreferi għal sustanza li se twassal għal rispons allerġiku wara kuntatt mal-ġilda kif definit mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) ([1]). Hemm qbil ġenerali dwar l-avvenimenti bijoloġiċi ewlenin li jwasslu għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-għarfien kurrenti dwar il-mekkaniżmi kimiċi u bijoloġiċi assoċjati mas-sensitizzazzjoni tal-ġilda nġabar fil-qosor bħala Perkors tal-Eżitu Avvers (AOP) skont il-programm tal-OECD dwar l-AOP (2), li jibda bl-avveniment ta' tnedija molekulari permezz, l-avvenimenti intermedji sal-effett avvers, jiġifieri dermatite ta' kuntatt allerġiku. F'dan il-każ, l-avveniment ta' tnedija molekulari (jiġifieri l-ewwel avveniment ewlieni) hu l-irbit kovalenti tas-sustanzi elettrofiliċi maċ-ċentri nukleofiliċi fil-proteini tal-ġilda. It-tieni avveniment ewlieni f'dan l-AOP iseħħ fil-keratinoċiti u jinkludi risponsi infjammatorji kif ukoll tibdiliet fl-espressjoni tal-ġeni assoċjati mal-pekorsi tas-sinjalar taċ-ċelloli speċifiċi bħall-perkorsi dipendenti fuq l-element ta' rispons tal-antiossidanti/elettrofili (ARE). It-tielet avveniment ewlieni hu l-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi (DC), tipikament ivvalutata bl-espressjoni ta' markaturi tal-wiċċ taċ-ċelloli, ta' kemikini u ta' ċitokini speċifiċi. Ir-raba' avveniment ewlieni hu l-attivazzjoni u l-proliferazzjoni taċ-ċelloli-T, li hu vvalutat b'mod indirett fl-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali (LLNA) (3).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 442E tal-OECD (2017). Dan jiddeskrivi l-assaġġi *in vitro* li jindirizzaw il-mekkaniżmi deskritti taħt l-avveniment ewlieni fl-attivazzjoni taċ-ċelloli dendritiċi tal-AOP għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (2). It-TM jinkludi testijiet li għandhom jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u dawk li mhumiex sensitizzaturi skont il-GHS tan-NU u s-CLP.

   It-testijiet deskritti f'dan it-TM huma:

   — It-Test tal-Attivazzjoni tal-Linji ta' Ċelloli Umani (h-CLAT)

   — It-Test ta' attivazzjoni tal-linja ta' ċelloli U937 (U-SENS™)

   — L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Interlewkin-8 (assaġġ IL-8 Luc)

3. It-testijiet inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar u fit-TG korrispondenti tal-OECD jistgħu jvarjaw b'rabta mal-proċedura użata biex jiġu ġenerati d-*data* u r-riżultati mkejla iżda jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-riżultati tat-testijiet dwar l-Avveniment Ewlieni fuq l-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi tal-AOP għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda filwaqt li jittieħed benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD.

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

▼M8

Sfond u prinċipji tat-testijiet inklużi fil-metodu ta' ttestjar ibbażat fuq l-avvenimenti ewlenin

4. Normalment, il-valutazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju. Il-metodi klassiċi li jużaw fniek tal-indi, it-Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek tal-Indi (GMPT) ta' Magnusson u ta' Kligman u t-Test Buehler (TM B.6) (4), jistudjaw kemm il-fażi ta' induzzjoni kif ukoll il-fażi ta' eliċitazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. It-testijiet murini, l-LLNA (TM B.42) (3) u ż-żewġ modifiki mhux radjoattivi tiegħu, LLNA: DA (TM B.50) (5) u LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), ilkoll jivvalutaw ir-rispons tal-induzzjoni b'mod esklużiv, u ġew aċċettati wkoll peress li jagħtu vantaġġ fuq it-testijiet fuq il-ħnieżer tal-indi f'termini tat-trattament xieraq tal-annimali flimkien ma' kejl oġġettiv tal-fażi ta' induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

5. Dan l-aħħar ġew adottati metodi ta' ttestjar *in chemico* u *in vitro* b'bażi mekkanistika li jindirizzaw l-ewwel avveniment ewlieni (TM B.59; l-Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi (7)), u t-tieni avveniment ewlieni (TM B.60; Metodu ta' Ttestjar tal-Luċiferaži ARE-Nrf2 (8)) tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda għall-kontribuzzjoni għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' periklu tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi.

6. Testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar jew jikkwantifikaw it-tibdil fl-espressjoni tal-markatur(i) tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjat mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u d-DC wara l-esponiment għas-sensitizzaturi (eż. CD54, CD86) jew it-tibdiliet fl-espressjoni ta' IL-8, ċitokina assoċjata mal-attivazzjoni tad-DC. Is-sensitizzaturi tal-ġilda ġew irrapportati li jinduċu l-espressjoni ta' markaturi tal-membrana taċ-ċelloli bħal CD40, CD54, CD80, CD83, u CD86 minbarra l-induzzjoni ta' ċitokini proinfjammatorji, bħal IL-1β u TNF-α, u diversi kemokini li jinkludu IL-8 (CXCL8) u CCL3 (9) (10) (11) (12), assoċjati mal-attivazzjoni tad-DC (2).

7. Madankollu, peress li l-attivazzjoni tad-DC tirrappreżenta biss avveniment ewlieni wieħed tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (2) (13), l-informazzjoni ġenerata bit-testijiet li jkejlu l-markaturi tal-attivazzjoni tad-DC waħedha jaf ma tkunx biżżejjed biex tinħareġ konklużjoni dwar il-preżenza jew l-assenza tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Għaldaqstant, id-*data* ġenerata bit-testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar hi proposta biex issostni d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) u dawk li mhumiex sensitizzaturi meta jintużaw fi ħdan Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA), flimkien ma' informazzjoni komplimentari rilevanti oħra, eż. derivata minn assaġġi *in vitro* li jindirizzaw avvenimenti ewlenin oħra tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kif ukoll metodi mhux tal-ittestjar, li jinkludu read-across minn analogi kimiċi (13). Eżempji tal-użu tad-*data* ġenerata b'dawn it-testijiet fi ħdan l-Approċċi Definiti, jiġifieir approċċi standardizzati kemm b'rabta mas-sett ta' sorsi ta' informazzjoni użati kif ukoll fil-proċedura applikata għad-*data* biex jinkiseb it-tbassir, ġew ippubblikati (13) u jistgħu jitħaddmu bħala elementi siewja fi ħdan IATA.

8. It-testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar ma jistgħux jintużaw waħedhom, u lanqas biex jissubkategorizzaw is-sensitizzaturi tal-ġilda fis-subkategoriji 1A u 1B kif definiti mill-GHS/mis-CLP tan-NU, għall-awtoritajiet li jimplimentaw dawn iż-żewġ subkategoriji fakultattivi, u lanqas biex titbassar il-potenza għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjonijiet tas-sikurezza. Madankollu, skont il-qafas regolatorju, riżultati pożittivi ġenerati b'dawn il-metodi jistgħu jintużaw waħedhom biex jikklassifikaw sustanza kimika fil-kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

▼M8

9. It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuża f’dan il-metodu ta’ ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat ([1]) u mhux b’rabta mal-applikabbiltà tat-testijiet għall-ittestjar ta’ sustanzi monokostitwenti, ta’ sustanzi multikostitwenti u/jew ta’ taħlitiet. Bħalissa hemm disponibbli informazzjoni limitata dwar l-applikabbiltà tat-testijiet għal sustanzi/taħlitiet multikostitwenti (14) (15). It-testijiet xorta waħda huma teknikament applikabbli għall-ittestjar ta’ sustanzi multikostitwenti u taħlitiet. Madankollu, qabel ma jintuża dan il-metodu ta’ ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta’ *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex ([2]). Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Barra minn hekk, meta jiġu ttestjati sustanzi multikostitwenti jew taħlitiet, għandha tingħata kunsiderazzjoni lill-interferenza possibbli tal-kostitwenti ċitotissiċi bir-risponsi osservati.

DOKUMENTAZZJONI

(1) In-Nazzjonijiet Uniti (2015) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

(3) Il-Kapitolu B.42 ta’ dan l-Anness: L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali.

(4) Il-Kapitolu B.6 ta’ dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda.

(5) Il-Kapitolu B.50 ta’ dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda. L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali. DA.

(6) Il-Kapitolu B.51 ta’ dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda. L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali. BrdU-ELISA.

(7) Il-Kapitolu B.59 ta’ dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda In Chemico: Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi (DPRA).

(8) Il-Kapitolu B.60 ta’ dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta’ Ttestjar tal-Luċiferaži ARE-Nrf2.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, u Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, u Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) F’Ġunju 2013, il-Laqgħa Konġunta tal-OECD qablet li, fejn possibbli, għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu “sustanza kimika tat-test” li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f’linji gwida tat-test ġodda u aġġornati tal-OECD.

([2]) Din is-sentenza ġiet proposta u maqbula fil-laqgħa ta’ April 2014 tad-WNT.

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, u Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Anness 1 u Anness 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

▼**M8**

Appendiċi 1

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: IT-TEST TAL-ATTIVAZZJONI TAL-LINJI TA' ĊELLOLI UMANI (H-CLAT)

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. L-h-CLAT jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjati mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u taċ-ċelloli dendritiċi (DC) (jiġifieri CD86 u CD54), fil-linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana THP-1, wara esponiment għas-sensitizzaturi (1)(2). Il-livelli ta' espressjoni mkejla tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 u tas-CD54 imbagħad jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.

2. L-h-CLAT ġie evalwat fi studju ta' validazzjoni koordinat mil-Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Annimali (EURL ECAAM) u f'rieżami bejn il-pari indipendenti sussegwenti mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-EURL ECVAM (ESAC). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, l-h-CLAT kien rakkomandat mill-EURL ECVAM (3) biex jintuża bħala parti minn IATA b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini tal-klassifikazzjoni u tat-tikkettar tal-perikli. Eżempji tal-użu tad-*data* tal-h-CLAT flimkien ma' informazzjoni oħra huma rrapportati fid-dokumentazzjoni (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. L-h-CLAT wera li kien trasferibbli għal-laboratorji esperjenzati f'tekniki tal-koltura taċ-ċelloli u fl-analiżi taċ-ċitometrija tal-fluss. Il-livell ta' riproduċibbiltà fil-previżjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mit-test hu fl-ordni ta' 80 % fi ħdan il-laboratorji u bejn il-laboratorji (3)(12). Ir-riżultati ġġenerati fl-istudju ta' validazzjoni (13) u fi studji ppubblikati oħra (14) b'mod ġenerali jindikaw li, meta mqabbla mar-riżultati tal-LLNA, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 85 % (N=142) b'sensittività ta' 93 % (94/101) u bi speċifiċità ta' 66 % (27/41) (fuq il-bażi ta' analiżi mill-ġdid minn EURL ECVAM (12) b'kunsiderazzjoni tad-*data* eżistenti kollha u mingħajr ma jiġu kkunsidrati r-riżultati negattivi għal sustanzi kimiċi b'Log Kow akbar minn 3,5 kif deskritt fil-paragrafu (4). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz bl-h-CLAT għandhom probabbiltà akbar li jikkonċernaw sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (4)(13)(15). Meħuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tal-metodu h-CLAT biex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Madankollu, il-valuri tal-akkuratezza mogħtija hawnhekk għall-h-CLAT bħala test waħdu huma indikattivi biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li t-test LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li l-metodu h-CLAT hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' mekkaniżmi ta' reazzjoni, ta' potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u ta' proprjetajiet fiżikokimiċi (3)(14)(15). Il-metodu tal-h-CLAT hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test solubbli jew li jifformaw dispersjoni stabbli (jiġifieri kollojde jew sospensjoni li fiha s-sustanza kimika tat-test ma tistabbilixxix ruħha u lanqas ma tissepara mis-solvent/mill-veikolu f'fażijiet differenti) f'solvent/veikolu xieraq (ara l-paragrafu 14). Is-sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 għandhom tendenza li jipproduċu riżultati negattivi foloz (14). Għaldaqstant, riżultati negattivi b'sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 ma għandhomx jiġu kkunsidrati. Madankollu, riżultati pożittivi

▼M8

miksuba b'sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 xorta waħda jistgħu jintużaw biex isostnu l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala sensitizzatur tal-ġilda. Barra minn hekk, minħabba l-kapaċità metabolika limitata tal-linja ta' ċelloli użata (16) u minħabba l-kundizzjonijiet tal-esperiment, proapteni (jiġifieri sustanzi li jeħtieġu attivazzjoni enzimatika, pereżempju enzimi P450) u preapteni (jiġifieri sustanzi attivati b'ossidazzjoni) b'mod partikolari dawk b'rata baxxa ta' ossidazzjoni jistgħu jipprovdu riżultati negattivi wkoll fl-h-CLAT (15). Is-sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti jistgħu jiġu vvalutati bl-h-CLAT (17), iżda sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom li jeħilsu l-istess tul ta' mewġa bħal istjoċjanat tal-fluworexxeina (FITC) jew bħala jodur tal-propidju (PI), jinterferixxu mad-detezzjoni ċitometrika tal-fluss u b'hekk ma jistgħux jiġu evalwati kif suppost bl-użu ta' antikorpi konjugati tal-FITC jew bl-użu tal-PI. F'każ bħal dan, antikorpi oħra taggjati bil-fluworokromu jew markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, rispettivament, jistgħu jintużaw dment li jkun jista' jintwera li jipprovdu riżultati simili bħall-antikorpi taggjati bl-FITC (ara l-paragrafu 24) jew il-PI (ara l-paragrafu 18), eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 1-2. Fid-dawl ta' dan ta' hawn fuq, riżultati negattivi għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tal-limitazzjonijiet iddikjarati u flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fi ħdan il-kuntest tal-IATA. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu h-CLAT għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, dan ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

5. Kif deskritt aktar 'il fuq, il-metodu h-CLAT isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Madankollu, għandu l-potenzjal li jikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni (4)(5)(9) ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA. Minkejja dan, hemm bżonn li jsir aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' *data* mill-bniedem, biex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tal-h-CLAT jistgħu jinformaw valutazzjoni tal-potenza.

6. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. Il-metodu h-CLAT hu assaġġ *in vitro* li jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli (jiġifieri CD86 u CD54) fuq linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana, iċ-ċelloli THP-1, wara esponiment għal 24 siegħa għas-sustanza kimika tat-test. Dawn il-molekuli tas-superfiċje huma markaturi tipiċi ta' attivazzjoni tat-THP-1 monoċitika u jistgħu jimitaw attivazzjoni tad-DC, li taqdi rwol kritiku fil-priming taċ-ċellola-T. It-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje jitkejlu b'ċitometrija tal-fluss wara tilwin taċ-ċelloli b'antikorpi taggjati bil-fluworokromu. Il-kejl taċ-ċitotossiċità jsir fl-istess ħin ukoll biex jiġi vvalutat jekk s-sovraregolazzjoni tal-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje sseħħx f'konċentrazzjonijiet subċitotossiċi. L-intensità relattiva tal-fluworexxenza tal-markaturi tas-superfiċje mqabbla mal-kontroll b'solvent/b'veikolu hi kkalkolata u tintuża fil-mudell tat-tbassir (ara l-paragrafu 26), b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

8. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 bħala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 sustanzi ta' profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 1.2. Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* ġenerata bil-kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 11) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 20-22), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

▼M8

PROĊEDURA

9. Dan it-test hu bbażat fuq il-protokoll nru 158 (18) tal-h-CLAT DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) li jirrappreżenta l-protokoll użat għall-istudju ta' validazzjoni koordinat mill-EURL ECVAM. Hu rakkomandat li dan il-protokoll jintuża meta jiġi implimentat u jintuża l-metodu h-CLAT fil-laboratorju. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin għall-metodu h-CLAT, li jinvolvi żewġ stadji: *assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* u *kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54*.

Tħejjija taċ-ċelloli

10. Il-linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana, THP-1, għandha tintuża għat-twettiq tal-metodu h-CLAT. Hu rakkomandat li ċ-ċelloli (TIB-202™) jinkisbu minn bank taċ-ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection.

11. Iċ-ċelloli THP-1 huma kolturati f'37°C f'5 % CO_2 u atmosfera umidifikata f'medium RPMI-1640 supplimentat b'10 % serum bovin fetali (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanol, 100 unità/ml peniċillina u 100 µg/ml streptomiċina. L-użu tal-peniċilina u tal-istreptomiċina fil-medium tat-tkabbir jista' jiġi evitat. Madankollu, f'każ bħal dan l-utenti għandhom jivverifikaw li l-assenza ta' antibijotiċi fil-medium tat-tkabbir ma jkollha ebda impatt fuq ir-riżultati, pereżempju billi jittestjaw is-sustanzi ta' profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 1.2. Fi kwalunkwe każ, biex jimminimizzaw ir-riskju ta' kontaminazzjoni, għandhom jiġu segwiti prattiki tajbin tal-koltura taċ-ċellola indipendentement mill-preżenza jew mill-assenza ta' antibijotiċi fil-medium tat-tkabbir taċ-ċelloli. Iċ-ċelloli THP-1 jinżergħu bħala rutina kull jumejn/t-lieta bid-densità ta' 0,1 sa 0,2 × 10^6 ċelloli/ml. Dawn għandhom jinżammu f'densitajiet minn 0,1 sa 1,0 × 10^6 ċelloli/ml. Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, iċ-ċelloli għandhom jiġu kwalifikati billi jsir kontroll tar-reattività. Il-kontroll tar-reattività taċ-ċelloli għandu jsir bl-użu tal-kontrolli pożittivi, it-2,4-dinitroklorobenżen (DNCB) (Nru CAS 97-00-7, ≥ 99 % purità) u s-sulfat tan-nikil ($NiSO_4$) (Nru CAS 10101-97-0, ≥ 99 % purità) u tal-kontroll negattiv, l-aċidu lattiku (LA) (Nru CAS 50-21-5, ≥ 85 % purità), ġimagħtejn wara li jinħallu. Kemm id-DNCB kif ukoll l-$NiSO_4$ għandhom jipproduċu rispons pożittiv tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 kif ukoll CD54, u l-LA għandu jipproduċi rispons negattiv tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 kif ukoll CD54. Huma biss iċ-ċelloli li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività li jintużaw għall-assaġġ. Iċ-ċelloli jistgħu jiġu propagati sa xahrejn wara li jinħallu. In-numru tal-passaġġ ma għandux jaqbeż it-30. Il-kontroll tar-reattività għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 20-24.

12. Għall-ittestjar, iċ-ċelloli THP-1 jinżergħu f'densità ta' 0,1 × 10^6 ċelloli/ml jew ta' 0,2 × 10^6 ċelloli/ml, u jiġu prekolturati fi flasks tal-koltura għal 72 siegħa jew għal 48 siegħa, rispettivament. Importanti li d-densità taċ-ċelloli fil-flask tal-koltura eżatt wara l-perjodu ta' qabel il-koltura tkun konsistenti kemm jista' jkun f'kull esperiment (billi tintuża waħda miż-żewġ kundizzjonijiet ta' prekoltura deskritti hawn fuq), għaliex id-densità taċ-ċelloli fil-flask tal-koltura eżatt wara l-prekoltura tista' taffettwa l-espressjoni ta' CD86/CD54 indotta minn allerġeni (19). Fil-jum tal-ittestjar, iċ-ċelloli miġbura mill-flask tal-koltura jerġgħu jiġu sospiżi b'medium tat-tkabbir frisk f'2 × 10^6 ċelloli/ml. Imbagħad, iċ-ċelloli jiġu distribwiti fi pjastra b'qiegħ ċatt b'24 bwejra (500 µl 1 × 10^6 ċelloli/bwejra) jew fi pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (80 µl 1,6 × 10^5 ċelloli/bwejra).

Assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża

13. *Assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* jsir għad-determinazzjoni tas-CV75, li hi l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tirriżulta f'vijabbiltà ta' 75 % taċ-ċelloli meta mqabbla mal-kontroll b'solvent/b'veikolu. Il-valur tas-CV75 jintuża biex tiġi determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-kejl tal-espressjoni ta' *CD86/CD54* (ara l-paragrafi 20-24).

▼M8

Thejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

14. Is-sustanzi kimiċi tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jitħejjew dakinhar tal-ittestjar. Għall-metodu h-CLAT, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew dispersi b'mod stabbli (ara wkoll il-paragrafu 4) f'salina jew f'medium bħala l-ewwel għażliet ta' solvent/veikolu jew f'sulfossidu tad-dimetil (DMSO, ≥ 99 % purità) bħala t-tieni għażla ta' solvent/veikolu jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli jew ma tifformax dispersjoni stabbli fiż-żewġ solventi/veikoli preċedenti, għal konċentrazzjonijiet finali ta' 100 mg/ml (f'salina jew f'medium) jew ta' 500 mg/ml (f'DMSO). Solventi/veikoli oħra li mhumiex dawk deskritti hawn fuq jistgħu jintużaw jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti. L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-veikolu finali għandha tiġi kkunsidrata.

15. Mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' 100 mg/ml (f'salina jew f'medium) jew ta' 500 mg/ml (f'DMSO) tas-sustanzi kimiċi tat-test, għandhom jitwettqu l-passi ta' dilwizzjoni li ġejjin:

— Għas-salina jew għall-medium bħala solvent/veikolu: Jitħejjew tmien soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet), b'dilwizzjonijiet serjali ta' darbtejn bl-użu tas-solvent/veikolu korrispondenti. Dawn is-soluzzjonijiet ewlenin ikomplu jiġu dilwiti 50 darba f'medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Jekk l-ogħla konċentrazzjoni finali fil-pjastra ta' 1 000 μg/ml ma tkunx tossika, il-konċentrazzjoni massima għandha terġa' tiġi determinata billi jsir test ġdid taċ-ċitotossiċità. Il-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5 000 μg/ml għal sustanzi kimiċi tat-test dissolti jew dispersi b'mod stabbli f'salina jew f'medium.

— Għal DMSO bħala solvent/veikolu. Jitħejjew tmien soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet), b'dilwizzjonijiet serjali ta' darbtejn bl-użu tas-solvent/veikolu korrispondenti. Dawn is-soluzzjonijiet ewlenin ikomplu jiġu dilwiti 250 darba f'medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Il-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż l-1 000 μg/ml anki jekk din il-konċentrazzjoni ma tkunx tossika.

Is-soluzzjonijiet għall-użu finalment jintużaw għall-esponiment billi jiżdied volum ugwali ta' soluzzjoni għall-użu fil-volum tas-sospensjoni taċ-ċelloli THP-1 fil-pjastra (ara wkoll il-paragrafu 17) biex tinkiseb dilwizzjoni ulterjuri ta' darbtejn (normalment, il-medda finali tal-konċentrazzjonijiet fil-pjastra tkun ta' 7,81–1 000 μg/ml).

16. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu użat fil-metodu h-CLAT hu l-medium tat-tkabbir (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli (ara l-paragrafu 4) b'medium jew b'salina) jew DMSO (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli f'DMSO) ittestjat f'konċentrazzjoni finali waħda fil-pjastra ta' 0,2 %. Dan issirlu l-istess dilwizzjoni bħal dik deskritta għas-soluzzjonijiet għall-użu fil-paragrafu 15.

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

17. Il-medium tat-tkabbir jew is-soluzzjonijiet għall-użu deskritti fil-paragrafi 15 u 16 jitħalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mħejjija fil-pjastra b'qiegħ ċatt b'24 bwejra jew b'96 bwejra (ara l-paragrafu 12). Imbagħad il-pjastri trattati jiġu inkubati għal 24±0,5 siegħa f'37°C f'5 % CO_2. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn bwejriet minn sustanzi kimiċi tat-test, eż. billi l-pjastra tiġi ssiġillata qabel l-inkubazzjoni bis-sustanzi kimiċi tat-test (20).

▼**M8**

Tilwin bil-jodur tal-propidju (PI)

18. Wara esponiment għal 24±0,5 siegħa, iċ-ċelloli jiġu trasferiti f'tubi tal-kampjun u jinġabru b'ċentfigurazzjoni. Is-supernatanti jintremew u ċ-ċelloli li jifdal jiġu sospiżi mill-ġdid b'200 µl (fil-każ ta' 96 bwejra) jew b'600 µl (fil-każ ta' 24 bwejra) salina baferjata bil-fosfat li jkun fiha 0,1 % albumina tas-serum tal-bovini (bafer tat-tilwin). 200 µl sospensjoni taċ-ċelloli tiġi trasferita fi pjastra b'qiegħ għat-tond b'96 bwejra (fil-każ ta' 96 bwejra) jew f'mikrotubu (fil-każ ta' 24 bwejra) u tinħasel darbtejn b'200 µl (fil-każ ta' 96 bwejra) jew b'600 µl (fil-każ ta' 24 bwejra) ta' bafer tat-tilwin. Finalment, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'bafer tat-tilwin (eż. 400 µl) u tiżdied soluzzjoni tal-PI (eż. 20 µl) (pereżempju l-konċentrazzjoni finali tal-PI tkun ta' 0,625 µg/ml). Jistgħu jintużaw markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, bħal 7-Amminoaċtinomiċina D (7-AAD), Tripan blu jew oħrajn jekk it-tilwin alternattiv ikun jista' jintwera li jipprovdi riżultati simili bħall-PI, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 1.2.

Kejl taċ-ċitotossiċità b'ċitometrija tal-flus u bi stima tal-valur tas-CV75

19. It-teħid tal-PI jiġi analizzat bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss bil-kanal ta' akkwiżizzjoni FL-3. B'kollox jinkisbu 10 000 ċellola ħajja (negattivi għall-PI). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tista' tiġi kkalkolata bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja mill-programm ta' analiżi taċ-ċitometru. Meta l-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun baxxa, għandhom jinkisbu sa 30 000 ċellola inklużi ċ-ċelloli mejtin. Inkella, id-*data* tista' tinkiseb għal minuta waħda wara t-tnedija tal-analiżi.

$$Vijabbiltà taċ - ċelloli = \frac{Numru\ ta'ċelloli\ hajjin}{Numru\ tatali\ ta'ċelloli\ miksuba} \times 100$$

Il-valur tas-CV75 (ara l-paragrafu 13), jiġifieri konċentrazzjoni li turi 75 % tas-sopravivenza taċ-ċelloli THP-1 (ċitotossiċità ta' 25 %), jiġi kkalkolat b'interpolazzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

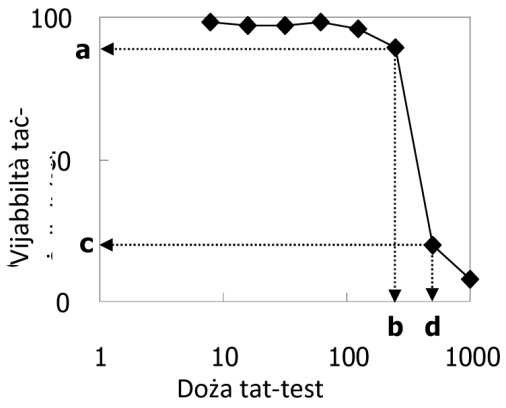
Fejn:

a hu l-valur minimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli ogħla minn 75 %

c hu l-valur massimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli anqas minn 75 %

b u d huma l-konċentrazzjonijiet li juru l-valur tal-vijabbiltà taċ-ċelloli a u c rispettivament

▼**M8**



Jistgħu jintużaw approċċi oħra biex tinkiseb is-CV75 dment li jintwera li dawn ma jkollhom ebda impatt fuq ir-riżultati (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza).

Kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54

Tħejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

20. Is-solvent/il-veikolu xieraq (salina, medium jew DMSO; ara l-paragrafu 14) jintuża biex jiddisolvi jew jiddispersa b'mod stabbli is-sustanzi kimiċi tat-test. Is-sustanzi kimiċi tat-test l-ewwel jiġu dilwiti għall-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-100 darba (għas-salina jew għall-medium) jew għall-500 darba (għal DMSO) tal-1,2 × CV75 determinata fl-*assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* (ara l-paragrafu 19). Jekk is-CV75 ma tkunx tista' tiġi determinata (jiġifieri ma tiġix osservata ċitotossiċità suffiċjenti fl-*assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża*), l-ogħla konċentrazzjoni solubbli jew dispersa stabbliment tas-sustanza kimika tat-test mħejjija b'kull solvent/veikolu għandha tintuża bħala l-konċentrazzjoni tat-tluq. Jekk jogħġbok kun af li l-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5 000 μg/ml (fil-każ ta' salina jew ta' medium) jew l-1 000 μg/ml (fil-każ ta' DMSO). Imbagħad isiru dilwizzjonijiet serjali ta' 1,2 darbiet bl-użu tas-solvent/tal-veikolu korrispondenti biex jinkisbu s-soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 100×1,2 × CV75 sa 100×0,335 × CV75 (għas-salina jew għall-medium) jew minn 500×1,2 × CV75 sa 500×0,335 × CV75 (għal DMSO)) li għandhom jiġu ttestjati fil-metodu h-CLAT (ara l-protokoll DB-ALM Nru 158 għal eżempju tal-iskema ta' dożaġġ). Imbagħad, is-soluzzjonijiet ewlenin jiġu dilwiti aktar għal 50 darba (għas-salina jew għall-medium) jew għal 250 darba (għal DMSO) fil-medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Dawn is-soluzzjonijiet huma dawk finalment użati għall-esponiment b'fattur finali ulterjuri ta' dilwizzjonijiet għal darbtejn fil-pjastra. Jekk ir-riżultati ma jissodisfawx il-kriterji ta' aċċettazzjoni deskritti fil-paragrafi 29 u 30 rigward il-vijabbiltà taċ-ċelloli, l-*assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* jista' jerġa' jsir biex tiġi determinata CV75 aktar preċiża. Jekk jogħġbok kun af li pjastri b'24 bwejra biss jistgħu jintużaw għall-kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54.

21. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu jitħejja kif deskritt fil-paragrafu 16. Il-kontroll pożittiv użat fil-metodu h-CLAT hu DNCB (ara l-paragrafu 11), li għalih jitħejjew soluzzjonijiet ewlenin f'DMSO u jiġu dilwiti kif deskritt għas-soluzzjonijiet ewlenin fil-paragrafu 20. DNCB għandu jintuża bħala l-kontroll pożittiv għall-*kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54* f'konċentrazzjoni waħda finali fil-pjastra (tipikament 4,0 μg/ml). Biex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 4,0 μg/ml ta' DNCB fil-pjastra, titħejja soluzzjoni ewlenija ta' 2 mg/ml ta' DNCB f'DMSO u tkompli tiġi dilwita għal 250 darba b'medium

▼M8

tat-tkabbir
għal soluzzjoni għall-użu ta' 8 µg/ml. Inkella, is-CV75 ta' DNCB, li tiġi determinata f'kull faċilità tat-test, tista' tintuża wkoll bħala l-konċentrazzjoni tal-kontroll pożittiv. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli. Għal kontrolli pożittivi, il-konċentrazzjoni finali waħda fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5 000 µg/ml (fil-każ ta' salina jew ta' medium) jew l-1 000 µg/ml (fil-każ ta' DMSO). Il-kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjoni huma l-istess bħal dawk deskritti għas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 29), ħlief għall-aħħar kriterju ta' aċċettazzjoni peress li l-kontroll pożittiv jiġi ttestjat f'konċentrazzjoni waħda.

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

22. Għal kull sustanza kimika tat-test u sustanza tal-kontroll, hu meħtieġ esperiment wieħed biex tinkiseb previżjoni. Kull esperiment jikkonsisti f'tal-anqas żewġ sessonijiet indipendenti għall-*kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54* (ara l-paragrafu 26-28). Kull sessjoni indipendenti ssir f'jum differenti jew fl-istess jum dment li għal kull sessjoni: a) jitħejjew soluzzjonijiet ewlenin u soluzzjonijiet użati friski indipendenti tas-sustanza kimika tat-test u tas-soluzzjonijiet tal-antikorpi u b) jintużaw ċelloli miġbura indipendentement (jiġifieri ċ-ċelloli jridu jinġabru minn flasks tal-koltura differenti); madankollu, iċ-ċelloli jistgħu jkunu ġejjin mill-istess passaġġ. Sustanzi kimiċi tat-test u sustanzi tal-kontroll imħejjija bħala soluzzjonijiet għall-użu (500 µl) jitħalltu ma' 500 µl ta' ċelloli sospiżi ($1x10^6$ ċelloli) fi proporzjon ta' 1:1, u ċ-ċelloli jiġu inkubati għal 24±0,5 siegħa kif deskritt fil-paragrafi 20 u 21. F'kull sessjoni, replika waħda għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanza tal-kontroll hi biżżejjed għaliex tbassir jinkiseb minn tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti.

It-tilwin u l-analiżi taċ-ċelloli

23. Wara 24±0,5 siegħa ta' esponiment, iċ-ċelloli jiġu trasferiti minn pjastra b'24 bwejra f'tubi tal-kampjun, jinġabru b'ċentrifugrazzjoni u mbagħad jinħaslu darbtejn b'1ml ta' bafer tat-tilwin (jekk ikun hemm bżonn jistgħu jitwettqu passi addizzjonali tal-ħasil). Wara l-ħasil, iċ-ċelloli jiġu mblokkati b'600 µl soluzzjoni tal-imblokkar (bafer tat-tilwin li fih 0,01 % (w/v) globulina (frazzjoni ta' Cohn II, III, umana; SIGMA, #G2388-10G jew ekwivalenti)) u inkubati f'4°C għal 15-il min. Wara l-imblokkar, iċ-ċelloli jinqasmu fi tliet alikwoti ta' 180 µl fi pjastra b'qiegħ fit-tond b'96 bwejra jew f'mikrotubu.

24. Wara ċ-ċentrifugrazzjoni, iċ-ċelloli jitlewnu b'50 µl ta' antikorpi anti-CD86, anti-CD54 jew IgG1 tal-ġrieden (isotip) tikkettati bl-FITC f'4°C għal 30 min. L-antikorpi deskritti fil-protokoll h-CLAT DB-ALM nru 158 (18) għandhom jintużaw b'dilwizzjoni ta' 3:25 v/v (għas-CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klonu: Fun-1)) jewta' 3:50 v/v (għas-CD54 (DAKO, #F7143; Klonu: 6,5B5) u IgG1 (DAKO, #X0927)) b'bafer tat-tilwin. Dawn il-fatturi ta' dilwizzjoni tal-antikorpi ġew definiti mill-iżviluppaturi tat-testijiet bħala dawk li jipprovdu l-aħjar proporzjon minn sinjal għal storbju. Fuq il-bażi tal-esperjenza tal-iżviluppaturi tat-test, l-intensità tal-fluworexxenza tal-antikorpi normalment tkun konsistenti bejn lottijiet differenti. Madankollu, l-utenti jistgħu jikkunsidraw it-titrazzjoni tal-antikorpi fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju tagħhom stess biex jiddefinixxu l-aħjar konċentrazzjonijiet għall-użu. Antikorpi anti-CD86 u/jew anti-CD54 oħra taggjati bil-fluworokromu jistgħu jintużaw jekk jista' jintwera li dawn jipprovdu riżultati simili bħall-antikorpi konjugati bl-FITC, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 1.2. Ta' min jinnota li t-tibdil tal-klonu jew tal-fornitur tal-antikorpi kif deskritt fil-protokoll h-CLAT DB-ALM nru 158 (18) jista' jaffettwa r-riżultati. Wara l-ħasil darbtejn jew aktar b'150 µl bafer tat-tilwin, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'bafer tat-tilwin (eż. 400 µl), u tiżdied is-soluzzjoni tal-PI (eż. 20 µl biex tinkiseb konċentrazzjoni finali ta'

▼M8

0,625 µg/ml) jew soluzzjoni ta' markatur ieħor taċ-ċitotossiċità (ara l-paragrafu 18). Il-livelli ta' espressjoni tas-CD86 u tas-CD54, u l-vijabbiltà taċ-ċelloli, jiġu analizzati bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss.

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-*data*

25. L-espressjoni tas-CD86 u tas-CD54 tiġi analizzat bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss bil-kanal ta' akkwiżizzjoni FL-1. Fuq il-bażi tal-intensità ġeometrika medja tal-fluworexxenza (MFI), l-intensità relattiva tal-fluworexxenza (RFI) tas-CD86 u tas-CD54 għaċ-ċelloli tal-kontroll pożittiv (ctrl) u trattati bis-sustanza kimika tiġi kkalkolata skont l-ekwazzjoni li ġejja:

$$RFI = \frac{MFI\ taċ - ċellula\ trattata\ kimika - MFI\ ta'ċelloli\ ta'\ kontroll\ ta'l - isotipi\ trattati\ kimiċi}{MFI\ tas - solvent/ċelloli\ ctrl\ trattati\ bil - vettura - MFI\ tas - solvent/ċelluli\ ctrl\ isotip\ trattati\ bil - vettura} \times 100$$

Il-vijabbiltà taċ-ċelloli miċ-ċelloli tal-kontroll bl-isotip (ctrl) (li jitlewnu b'antikorpi tal-IgG1 tal-ġrieden (isotip)) tiġi kkalkolata wkoll skont l-ekwazzjoni deskritta fil-paragrafu 19.

Mudell ta' tbassir

26. Għall-kejl tal-espressjoni ta' *CD86/CD54*, kull sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti biex jinkiseb tbassir wieħed (POŻITTIV jew NEGATTIV). Tbassir h-CLAT jitqies POŻITTIV jekk tal-anqas tiġi ssodisfata waħda mill-kundizzjonijiet li ġejjin fi 2 minn 2 sessjonijiet indipendenti jew f'tal-anqas 2 minn 3, inkella t-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV (Figura 1):

— L-RFI tas-CD86 tkun daqs jew akbar minn 150 % fi kwalunkwe konċentrazzjoni ttestjata (b'vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 50 %);

— L-RFI tas-CD54 tkun daqs jew akbar minn 200 % fi kwalunkwe konċentrazzjoni ttestjata (b'vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 50 %).

27. Fuq il-bażi ta' dan li ntqal hawn fuq, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu pożittivi għas-CD86 u/jew it-tnejn ikunu pożittivi għas-CD54, it-tbassir h-CLAT jitqies POŻITTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. B'mod simili, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet ikunu negattivi għaż-żewġ markaturi, it-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV (b'kunsiderazzjoni dovuta tad-dispożizzjonijiet tal-paragrafu 30) mingħajr il-bżonn tat-tielet sessjoni. Madankollu, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet ma jkunux jaqblu għal tal-anqas wieħed mill-markaturi (CD54 jew CD86), ikun hemm bżonn tat-tielet sessjoni u t-tbassir finali jkun ibbażat fuq ir-riżultat tal-maġġoranza tat-tliet sessjonijiet individwali (jiġifieri 2 minn 3). F'dan ir-rigward, ta' min jinnota li jekk isiru żewġ sessjonijiet indipendenti u waħda minnhom biss tkun pożittiva għas-CD86 (minn hawn 'il quddiem imsejħa P_1) u l-oħra tkun pożittiva biss għas-CD54 (minn hawn 'il quddiem imsejħa P_2), ikun hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Jekk din it-tielet sessjoni tkun negattiva għaż-żewġ markaturi (minn hawn 'il quddiem imsejħa N), it-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV. Min-naħa l-oħra, jekk it-tielet sessjoni tkun pożittiva għal wieħed mill-markaturi (P_1 jew P_2) jew għaż-żewġ marktaturi (minn hawn 'il quddiem imsejħa P_{12}), t

▼**M8**

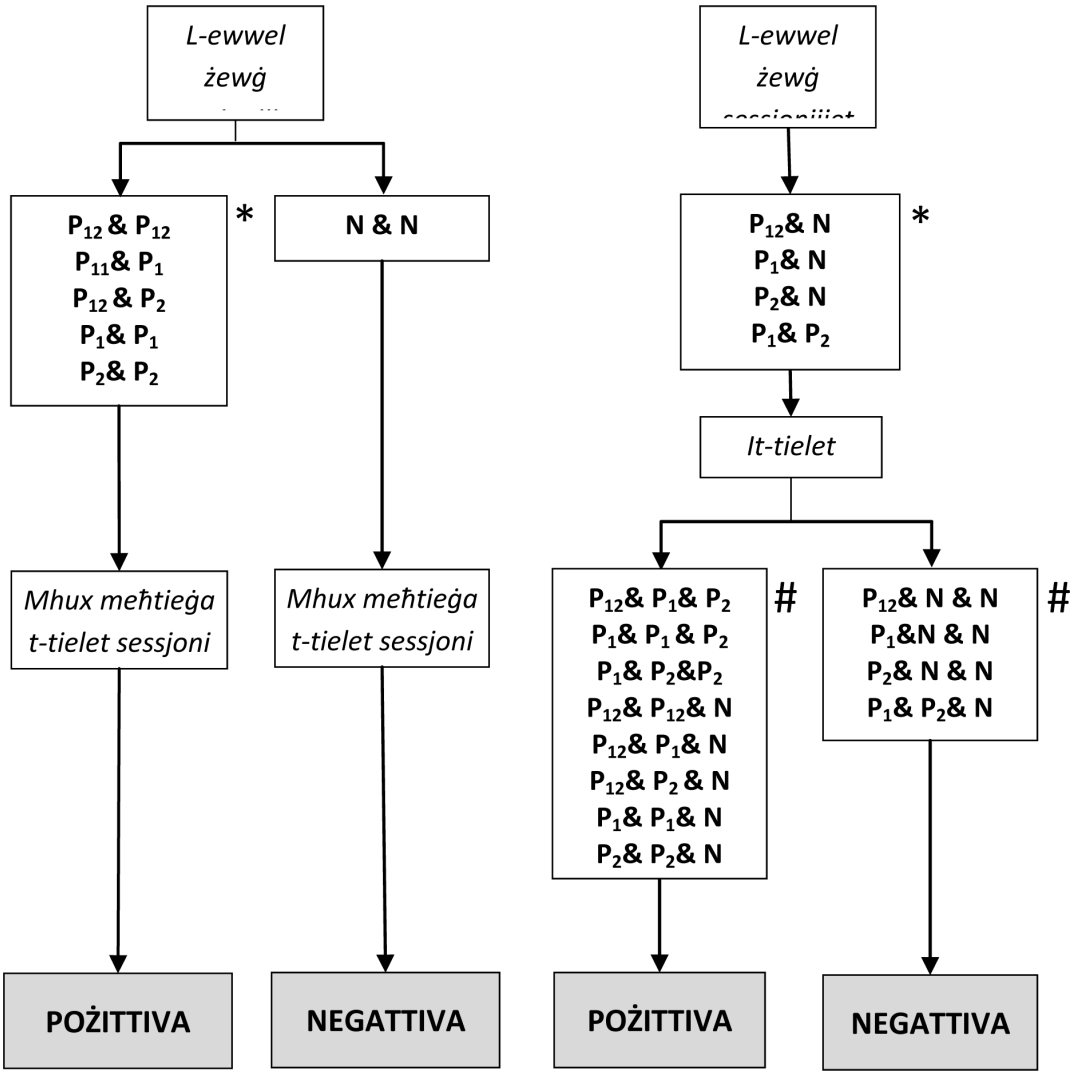


Figura 1: Mudell tat-tbassir użat fil-metodu h-CLAT. Tbassir h-CLAT għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjoni tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali.

P_1: sessjoni b'CD86 pożittiv biss; P_2; sessjoni b'CD54 pożittiv biss; P_{12}: sessjoni b'CD86 kif ukoll CD54 pożittivi; N: sessjoni mingħajr CD86 u CD54 pożittivi.

*Il-kaxex juru t-taħlitiet rilevanti tar-riżultati mill-ewwel żewġ sessjonijiet, indipendentement mill-ordni li fiha jistgħu jinkisbu.

#Il-kaxex juru t-taħlitiet rilevanti ta' riżultati mit-tliet sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel żewġ sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq, iżda ma jirriflettux l-ordni li fiha jistgħu jinkisbu.

28. Għas-sustanzi kimiċi tat-test imbassra bħala POŻITTIVI bl-h-CLAT, b'mod fakultattiv jistgħu jiġu determinati żewġ valuri tal-Konċentrazzjonijiet Effettivi (EC), l-EC150 għas-CD86 u l-EC200 għas-CD54, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha s-sustanzi kimiċi tat-test jinduċu RFI ta' 150 jew ta' 200. Dawn il-valuri tal-EC potenzjalment jistgħu jikkontribwixxu għall-valutazzjoni tal-potenza tas-sensitizzazzjoni (9) meta jintużaw f'approċċi integrati bħall-IATA (4) (5) (6) (7) (8). Dawn jistgħu jiġu kkalkolati bl-ekwazzjonijiet li ġejjin:

▼M8

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

fejn

A_{conc} hi l-anqas konċentrazzjoni f'μg/ml bl-RFI > 150 (CD86) jew 200 (CD54)

B_{conc} hi l-ogħla konċentrazzjoni f'μg/ml bl-RFI < 150 (CD86) jew 200 (CD54)

A_{RFI} hi l-RFI fl-anqas konċentrazzjoni bl-RFI > 150 (CD86) jew 200 (CD54)

B_{RFI} hi l-RFI fl-ogħla konċentrazzjoni bl-RFI < 150 (CD86) jew 200 (CD54)

Għall-finijiet ta' derivazzjoni aktar preċiża tal-valuri tal-EC150 u tal-EC200, jistgħu jkunu meħtieġa tliet sessjonijiet indipendenti għall-*kejl tal-espressjoni tas-CD86/CD54*. Imbagħad il-valuri finali tal-EC150 u tal-EC200 jiġu determinati bħala l-valur medjan tal-ECs ikkalkolati mit-tliet sessjonijiet indipendenti. Meta tnejn biss mit-tliet sessjonijiet indipendenti jissodisfaw il-kriterji għall-pożittività (ara l-paragrafi 26-27), tiġi adottata l-ogħla waħda mill-EC150 jew mill-EC200 taż-żewġ valuri kkalkolati.

Kriterji ta' aċċettazzjoni

29. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża l-metodu h-CLAT (22) (27).

— Il-vijabbiltajiet taċ-ċelloli tal-medium u l-kontrolli b'solvent/b'veikolu għandhom ikunu akbar minn 90 %.

— Fil-kontroll b'solvent/b'veikolu, il-valuri tal-RFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 ma għandhomx jaqbżu l-kriterji pożittivi (CD86 RFI ≥ 150 % u CD54 RFI ≥ 200 %). Il-valuri tal-RFI tal-kontroll b'solvent/b'veikolu jiġu kkalkolati bl-użu tal-formula deskritta fil-paragrafu 25 (MFI tas-sustanza kimika għandha tiġi sostitwita bMFI tas-solvent/tal-veikolu, u MFI tas-solvent/tal-veikolu għandha tiġi sostitwita bMFI ta' kontroll (b'medium)).

— Għall-kontrolli b'medium kif ukoll dawk b'solvent/b'veikolu, il-proporzjon tal-MFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 għall-kontroll b'isotip għandu jkun > 105 %.

— Fil-kontroll pożittiv (DNCB), il-valuri tal-RFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 għandhom jissodisfaw il-kriterji pożittivi (CD86 RFI ≥ 150 u CD54 RFI ≥ 200) u l-vijabbiltà taċ-ċelloli għandha tkun akbar minn 50 %.

— Għas-sustanza kimika tat-test, il-vijabbiltà taċ-ċelloli għandha tkun akbar minn 50 % f'tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet ittestjati f'kull sessjoni.

30. Ir-riżultati negattivi jkunu aċċettabbli biss għal sustanzi kimiċi tat-test li jesibixxu vijabbiltà taċ-ċelloli ta' anqas minn 90 % fl-ogħla konċentrazzjoni ttestjata (jiġifieri 1,2 × CV75 skont l-iskema ta' dilwizzjonijiet serjali deskritta fil-paragrafu 20). Jekk il-vijabbiltà taċ-ċelloli f'1,2 × CV75 tkun daqs jew akbar minn 90 %, ir-riżultat negattiv għandu jiġi injorat. F'dan il-każ, hu rakkomandat li wieħed jipprova jirfina l-għażla tad-doża billi jirrepeti d-determinazzjoni tas-CV75. Ta' min jinnota li meta jintużaw 5 000 μg/ml f'salina (jew f'medium jew f'solventi/veikoli oħra), 1 000 μg/ml f'DMSO jew l-ogħla konċentrazzjoni solubbli bħala l-konċentrazzjoni massimali tat-test ta' sustanza kimika tat-test, riżultat negattiv ikun aċċettabbli anki jekk il-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun akbar minn 90 %.

▼M8

Rapport tat-test

31. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja.

Sustanza kimika tat-test

Sustanza monokostitwenti

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, il-Log Kow, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita

— Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Kontrolli

Kontroll pożittiv

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, il-Log K_{ow} is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

▼**M8**

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, tħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv u b'solvent/b'veikolu

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintuża solvent/veikolu ieħor li ma jkunx fost dawk imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Il-kundizzjonijiet tat-test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tat-test użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-faċilità mnejn inkisbet);

— Iċ-ċitometrija tal-fluss użata (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrumenti, il-globulina, l-antikorpi u l-markatur taċ-ċitotossiċità użat;

— Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tat-test bl-ittestjar ta' sustanzi ta' profiċjenza, u l-proċedura użata biex tintwera prestazzjoni riproduċibbli tat-test maż-żmien, eż. *data* storika tal-kontroll u/jew *data* storika tal-kontrolli tar-reattività.

Kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test

— Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, tal-MFI u tal-RFI miksuba bil-kontroll b'solvent/b'veikolu meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;

— Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tal-RFI miksuba bil-kontroll pożittiv meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;

— Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-konċentrazzjonijiet ittestjati kollha tas-sustanza kimika tat-test.

▼**M8**

Il-proċedura tat-test

— In-numru ta' sessjonijiet użati;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika, l-applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment użat (jekk ikun differenti minn dak rakkomandat)

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

— Tabulazzjoni tad-*data*, inklużi s-CV75 (jekk applikabbli), il-valuri ġeometriċi tal-MFI, tal-RFI u tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, il-valuri tal-EC150/EC200 (jekk applikabbli) miksuba għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontroll pożittiv f'kull sessjoni, u indikazzjoni tal-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont il-mudell tat-tbassir;

— Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-riżultati

— Diskussjoni tar-riżultati miksubin bil-metodu h-CLAT;

— Kunsiderazzjoni tar-riżultati tat-test fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Aċċessibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Aċċessibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Aċċessibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Aċċessibbli fuq: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi, Franza, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En)

(23) In-Nazzjonijiet Uniti (2013) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼**M8**

Appendiċi 1.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (21).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (22).

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew taħlita

CV75: Il-konċentrazzjoni stmata li turi vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 75 %.

EC150: il-konċentrazzjonijiet li juru l-valuri tal-RFI ta' 150 fl-espressjoni ta' CD86

EC200: il-konċentrazzjonijiet li juru l-valuri tal-RFI ta' 200 fl-espressjoni ta' CD54

Ċitometrija tal-fluss: teknika ċitometrika li fiha ċ-ċelloli sospiżi fi fluwidu jiffluwixxu waħda, waħda permezz ta' fokus ta' dawl tal-eċitament, li jitferrex f'mudelli karatteristiċi għaċ-ċelloli u għall-komponenti tagħhom; iċ-ċelloli spiss jiġu tikkettati b'markaturi fluworexxenti biex id-dawl l-ewwel jiġi assorbit imbagħad jinħeles fi frekwenzi differenti.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), għall-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew għall-valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-ħtieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

Kontroll b'medium: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn biex jiġi determinat jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

▼M8

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tul iż-żmien tkun tista' tiġi vvalutata, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Preapteni: sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika

Proapteni: sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jeħilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda

Intensità relattiva tal-fluworexxenza (RFI): Valuri relattivi tal-intensità medja ġeometrika tal-fluworexxenza (MFI) f'ċelloli trattati bis-sustanza kimika meta mqabbla mal-MFI f'ċelloli trattati b'solvent/b'veikolu.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (21).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorarji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (21).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (21).

Bafer tat-tilwin: Salina baferjata b'fosfat li fiha 0,1 % albumina tas-serum tal-bovini.

Kontroll b'solvent/b'veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test ħlief tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bażi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbliment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull additiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mingħajr ma tinbidel il-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu.

▼**M8**

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (23).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Test validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (21).

▼**M8**

Appendiċi 1.2

SUSTANZI TA' PROFIĊJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu b'mod korrett it-tbassir mistenni tal-h-CLAT għall-10 sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri tas-CV70, tal-EC150 u tal-EC200 li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza. Is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bil-metodu h-CLAT. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għall-metodu h-CLAT (3) (14).

Tabella 1

Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bil-metodu h-CLAT

Sustanzi ta' Profiċjenza	CASRN	Stat fiżiku	Tbassir *in vivo* (1)	Medda ta' Riferiment ta' CV75 f'µg/ml (2)	Riżultati tal-h-CLAT għal CD86 (Medda ta' Riferiment ta' EC150 f'µg/ml) (2)	Riżultati tal-h-CLAT għal CD54 (Medda ta' Riferiment ta' EC200 f'µg/ml) (2)
2,4-Dinitroklorobenżen	97-00-7	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	2-12	Pożittiv (0,5-10)	Pożittiv (0,5-15)
4-Fenilenediammina	106-50-3	Solidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	5-95	Pożittiv (<40)	Negattiv (>1,5) (3)
Sulfat tan-nikil	10101-97-0	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	30-500	Pożittiv (<100)	Pożittiv (10-100)
2-Merkaptbenżotjażol	149-30-4	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	30-400	Negattiv (>10) (3)	Pożittiv (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Likwidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	>20	Negattiv (>5) (3)	Pożittiv (<250)
Urea tal-imidażolidinil	39236-46-9	Solidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	25-100	Pożittiv (20-90)	Pożittiv (20-75)
Isopropanol.	67-63-0	Likwidu	Mhux sensitizzatur	>5 000	Negattiv (>5 000)	Negattiv (>5 000)
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	>5 000	Negattiv (>5 000)	Negattiv (>5 000)
Aċidu lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	1500-5 000	Negattiv (>5 000)	Negattiv (>5 000)
4-aċidu aminobenżojku	150-13-0	Solidu	Mhux sensitizzatur	>1 000	Negattiv (>1 000)	Negattiv (>1 000)

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

(1) It-tbassir tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* hu bbażat fuq *data* tal-LLNA (3) (14). Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (24).

(2) Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (13) (25).

(3) Storikament, maġġoranza tar-riżultati negattivi nkisbet għal dan il-markatur u, għalhekk, hu primarjament mistenni riżultat negattiv. Il-medda pprovduta ġiet definita fuq il-bażi tal-ftit riżultati pożittivi storiċi osservati. F'każ li jinkiseb riżultat pożittiv, il-valur tal-EC għandu jkun fi ħdan il-medda ta' riferiment rapportata.

▼**M8**

Appendiċi 2

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TA' ATTIVAZZJONI TAL-LINJA TA' ĊELLOLI U937 (U-SENS™)

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. It-test U-SENS™ jikkwantifika t-tibdil fl-espressjoni ta' markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjat mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u taċ-ċelloli dendritiċi (DC) (jiġifieri CD86), fil-linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana U937, wara esponiment għas-sensitizzaturi (1). Il-livelli ta' espressjoni mkejla tal-markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 fil-linja ta' ċelloli U937 imbagħad jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.

2. It-test U-SENS™ ġie evalwat fi studju tal-validazzjoni (2) koordinat minn L'Oreal u wara sarlu rieżami bejn il-pari indipendenti mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv (ESAC) tal-Laboratorju ta' Riferiment tal-Unjoni Ewropea għall-Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Annimali (EURL ECVAM) (3). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, il-U-SENS™ kien rakkomandat mill-EURL ECVAM (4) biex jintuża bħala parti minn IATA b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini ta' klassifikazzjoni u ta' tikkettar tal-perikli. Fid-dokument ta' gwida tagħha dwar ir-rapportar ta' approċċi strutturata għall-integrazzjoni tad-*data* u għas-sorsi ta' informazzjoni individwali użati fi ħdan IATA għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, bħalissa l-OECD qed tiddiskuti numru ta' studji tal-każ li jiddeskrivu strateġiji ta' ttestjar u mudelli ta' tbassir differenti. Wieħed mill-approċċi definiti differenti hu bbażat fuq l-assaġġ U-SENS (5). Eżempji tal-użu ta' *data* ta' U-SENS™ flimkien ma' informazzjoni oħra, inkluża *data* storika u *data* umana valida eżistenti (6), huma rapportati wkoll f'postijiet oħra fid-dokumentazzjoni (4) (5) (7).

3. It-test U-SENS™ wera li kien trasferibbli għal-laboratorji esperjenzati f'tekniki tal-koltura taċ-ċelloli u fl-analiżi taċ-ċitometrija tal-fluss. Il-livell ta' riproduċibbiltà fil-previżjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mit-test hu fl-ordni ta' 90 % u 84 % fi ħdan il-laboratorji u bejn il-laboratorji, rispettivament (8). Ir-riżultati ġġenerati fl-istudju ta' validazzjoni (8) u fi studji ppubblikati oħra (1) b'mod ġenerali jindikaw li, meta mqabbla mar-riżultati tal-LLNA, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 86 % (N=166) b'sensittività ta' 91 % (118/129) u bi speċifiċità ta' 65 % (24/37). Meta mqabbla mar-riżultati umani, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 77 % (N=101) b'sensittività ta' 100 % (58/58) u bi speċifiċità ta' 47 % (20/43). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz imqabbla mal-LLNA bil-U-SENS™ għandhom probabbiltà akbar li jikkonċernaw sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (1) (8) (9). Meħuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tat-test U-SENS™ biex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Madankollu, il-valuri tal-akkuratezza mogħtija hawnhekk għall-U-SENS™ bħala test waħdu huma indikattivi biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li t-test LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

▼M8

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li t-test U-SENS™ kien applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test (inklużi ingredjenti kożmetiċi, eż. preservattivi, tensjoattivi, attivi, koloranti) li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' proprjetajiet fiżikokimiċi, ta' potenza ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif determinata fi studji *in vivo*) u tal-ispettru ta' mekkaniżmi ta' reazzjoni magħruf li jkunu assoċjati ma' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri aċċettatur ta' Michael, formazzjoni bażi ta' Schiff, aġent ta' trasferiment tal-aċil, sostituzzjoni nukleofilika bimolekultari [SN2], jew sostituzzjoni aromatika nukleofilika [SNAr]) (1) (8) (9) (10). It-test U-SENS™ hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li huma solubbli jew li jifformaw dispersjoni stabbli (jiġifieri kollojde jew sospensjoni li fiha s-sustanza kimika tat-test ma tistabbilixxix ruħha u lanqas ma tissepara mis-solvent/mill-veikolu f'fażijiet differenti) f'solvent/veikolu xieraq (ara l-paragrafu 13). Sustanzi kimiċi fis-sett tad-*data* rapportat bħala preapteni (jiġifieri sustanzi attivati b'ossidazzjoni) jew proapteni (jiġifieri sustanzi li jeħtieġu attivazzjoni enzimatika, pereżempju permezz tal-enzimi P450) tbassru kif suppost mill-U-SENS™ (1) (10). Sustanzi li jinterferixxu mal-membrana jistgħu jwasslu għal riżultatipożittivi foloz minħabba żieda mhux speċifika ta' espressjoni ta' CD86, hekk kif tlieta minn seba' pożittivi foloz relatati mal-klassifikazzjoni ta' riferiment *in vivo* kienu tensjoattivi (1). B'hekk, riżultati pożittivi b'tensjoattivi għandhom jiġu kkunsidrati bil-galbu filwaqt li riżultati negattivi b'tensjoattivi xorta waħda jistgħu jintużaw b'sostenn tal-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala mhux sensitizzatur. Is-sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti jistgħu jiġu vvalutati bil-U-SENS™ (1), iżda sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom li jeħilsu l-istess tul ta' mewġa bħal istjoċjanat tal-fluworexxeina (FITC) jew bħala jodur tal-propidju (PI), jinterferixxu mad-detezzjoni ċitometrika tal-fluss u b'hekk ma jistgħux jiġu evalwati kif suppost bl-użu ta' antikorpi konjugati tal-FITC (negattiv falz potenzjali) jew bl-użu tal-PI (il-vijabbiltà ma tistax titkejjel). F'każ bħal dan, antikorpi oħra taggjati bi fluworokromu jew markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, rispettivament, jistgħu jintużaw dment li jkun jista' jintwera li jipprovdu riżultati simili bħall-antikorpi taggjati bl-FITC jew il-PI (ara l-paragrafu 18), eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Fid-dawl ta' dan ta' hawn fuq, ir-riżultati pożittivi b'tensjoattivi u r-riżultati negattivi b'sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tal-limitazzjonijiet iddikjarati u flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fi ħdan il-kuntest tal-IATA. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tat-test U-SENS™ għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, dan ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

5. Kif deskritt aktar 'il fuq, it-test U-SENS™ isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Madankollu, għandu l-potenzjal li jikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA. Minkejja dan, hemm bżonn li jsir aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' data mill-bniedem, biex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tal-U-SENS™ jistgħu jinformaw valutazzjoni tal-potenza.

6. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 2.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. It-test U-SENS™ hu assaġġ *in vitro* li jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 fuq linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana, iċ-ċelloli U937, wara esponiment għal 45±3 sigħat għas-sustanza kimika tat-test. Il-markatur tas-superfiċje CD86 hu markatur tipiku minnhom tal-attivazzjoni tal-U937. Is-CD86 hu magħruf bħala molekula kostimolatorja li tista' timita l-attivazzjoni monoċitika, li taqdi rwol kritiku fil-primazzjoni taċ-ċelloli-T. It-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 jitkejlu b'ċitometrija tal-fluss wara tilwin taċ-ċelloli, tipikament b'antikorpi tikkettati (bl-FITC) tal-istjoċjanat tal-fluworexxeina. Il-kejl taċ-ċitotossiċità jsir fl-istess ħin ukoll (eż. bl-użu tal-PI) biex jiġi vvalutat jekk s-sovraregolazzjoni tal-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje

▼M8

taċ-ċelloli CD86 isseħħx f'konċentrazzjonijiet subċitotossiċi. L-indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tal-markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli mqabbel mal-kontroll b'solvent/b'veikolu hu kkalkolat u jintuża fil-mudell tat-tbassir (ara l-paragrafu 19), b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

8. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 bħala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 11 f'konformità mal-Prattiki Tajba tal-Metodi *in vitro* (11). Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* ġenerata bil-kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 11) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 15-16), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

PROĊEDURA

9. Dan it-test hu bbażat fuq il-protokoll nru 183 (12) tal-U-SENS™ DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM). Għandhom jitħaddmu l-Proċeduri Operatorji Standard (SOP) meta jiġi implimentat u meta jintuża t-test U-SENS™ fil-laboratorju. Tista' tintuża sistema awtomatizzata biex isir il-U-SENS™ jekk ikun jista' jintwera li din tipprovdi riżultati simili, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin għat-test U-SENS™.

Tħejjija taċ-ċelloli

10. Il-linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana, U937 (13), għandha tintuża għat-twettiq tat-test U-SENS™. Iċ-ċelloli (klonu CRL1593.2) għandhom jinkisbu minn bank taċ-ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection.

11. Iċ-ċelloli U937 huma kolturati f'37°C f'5 % CO_2 u atmosfera umidifikata f'medium RPMI-1 640 supplimentat b'10 % serum tal-għoġġiela fetali (FCS), 2 mM L-glutammina, 100 unità/ml peniċillina u 100 µg/ml streptomiċina (medium komplut). Iċ-ċelloli U937 jiġu passaġġati bħala rutina kull jumejn/tlieta bid-densità ta' 1,5 jew 3×10^5 ċelloli/ml, rispettivament. Id-densità taċ-ċelloli ma għandhiex taqbeż it-2×10^6 ċelloli/ml u l-vijabbiltà taċ-ċelloli mkejla bl-esklużjoni tal-blu tirpan għandha tkun ≥ 90 % (ma għandhiex tiġi applikata fl-ewwel passaġġ wara t-taħlil). Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, kull lott ta' ċelloli, ta' FCS jew ta' antikorp għandu jiġi kwalifikat billi jsir kontroll tar-reattività. Il-kontroll tar-reattività taċ-ċelloli għandu jsir bl-użu tal-kontroll pożittiv, l-aċidu pikrilsulfoniku (2,4,6-Trinitro-benżenaċidu sulfoniku: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, ≥ 99 % purità), u l-kontroll negattiv, aċidu lattiku (LA) (CASRN 50-21-5, ≥ 85 % purità), tal-anqas ġimgħa wara t-taħlil. Għall-kontroll tar-reattività, għandhom jiġu ttestjati sitt konċentrazzjonijiet finali għal kull wieħed miż-2 kontrolli (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100µg/ml u LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). TNBS solubilizzat f'medium komplut għandu jipproduċi rispons pożittiv u relatat mal-konċentrazzjoni tas-CD86 (eż. meta konċentrazzjoni pożittiva, S.I. tas-CD86 ≥ 150, tkun segwita minn konċentrazzjoni b'S.I. tas-CD86 li jibqa' jiżdied), u LA solubilizzat f'medium komplut għandu jipproduċi rispons negattiv tas-CD86 (ara l-paragrafu 21). Hu biss il-lott ta' ċelloli li jgħaddi mill-kontroll tar-reattività darbtejn li għandu jintuża għall-assaġġ. Iċ-ċelloli jistgħu jiġu propagati sa seba' ġimgħat wara li jinħallu. In-numru tal-passaġġ ma għandux jaqbeż il-21. Il-kontroll tar-reattività għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 18-22.

▼M8

12. Għall-ittestjar, iċ-ċelloli U937 jinżergħu f'densità ta' 3 x 10^5 ċelloli/ml jew 6 × 10^5 ċelloli/ml, u jiġu prekolturati fi flasks tal-koltura għal jumejn jew għal jum (1), rispettivament. Jistgħu jintużaw kundizzjonijiet prekolturati oħra differenti minn dawk deskritti hawn fuq jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti u jekk ikun jista' jintwera li dawn jipprovdu riżultati simili, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Fil-jum tal-ittestjar, iċ-ċelloli miġbura mill-flask tal-koltura jerġgħu jiġu sospiżi b'medium tat-tkabbir frisk f'5 × 10^5 ċelloli/ml. Imbagħad, iċ-ċelloli jitqassmu fi pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra b'100 µl (densità finali taċ-ċelloli ta' 0,5 × 10^5 ċelloli/bwejra).

Thejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

13. Il-valutazzjoni tas-solubbiltà ssir qabel l-ittestjar. Għal dan l-għan, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew dispersi b'mod stabbli f'konċentrazzjoni ta' 50 mg/ml f'medium komplut bħala s-solvent tal-ewwel għażla jew id-dimetil sulfossidu (DMSO, ≥ 99 % purità) bħala s-solvent/il-veikolu tat-tieni għażla jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fis-solvent/fil-veikolu tal-medium komplut. Għall-ittestjar, is-sustanza kimika tat-test tiġi dissolta sa konċentrazzjoni finali ta' 0,4 mg/ml f'medium komplut jekk is-sustanza kimika tkun solubbli f'dan is-solvent/il-veikolu. Jekk is-sustanza kimika tkun solubbli f'DMSO biss, is-sustanza kimika tiġi dissolta f'konċentrazzjoni ta' 50 mg/ml. Solventi/veikoli oħra li mhumiex dawk deskritti hawn fuq jistgħu jintużaw jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti. L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-veikolu finali għandha tiġi kkunsidrata.

14. Is-sustanzi kimiċi tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jitħejjew dakinhar tal-ittestjar. Minħabba li ma jsirx assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża, għall-ewwel sessjoni għandhom jiġu ttestjati sitt konċentrazzjonijiet finali (1, 10, 20, 50, 100 u 200 µg/ml) fis-solvent/fil-veikolu korrispondenti f'medium komplut jew inkella f'medium ta' 0,4 % DMSO. Għas-sessjonijiet sussegwenti, b'bidu miż-0,4 mg/ml f'medium komplut jew b'50 mg/ml f'DMSO, is-soluzzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-anqas jitħejjew 4 soluzzjonijiet għall-użu (jiġifieri tal-anqas 4 konċentrazzjonijiet) bl-użu tas-solvent/tal-veikolu korrispondenti. Is-soluzzjonijiet għall-użu finalment jintużaw għat-trattament billi jiżdied volum ugwali ta' sospensjoni taċ-ċelloli U937 (ara l-paragrafu 11 aktar 'il fuq) mal-volum tas-soluzzjoni għall-użu fil-pjastra biex tinkiseb dilwizzjoni ulterjuri ta' darbtejn (12). Il-konċentrazzjonijiet (tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet) għal kwalunkwe sessjoni ulterjuri jintgħażlu fuq il-bażi tar-riżultati individwali tas-sessjonijiet preċedenti kollha (8). Il-konċentrazzjonijiet finali utilizzabbli huma ta' 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 u 200 µg/ml. Il-konċentrazzjoni finali massima hi ta' 200 µg/ml. Fil-każ li jiġi osservat valur pożittiv tas-CD86 f'1 µg/ml, 0,1 µg/ml tiġi evalwata biex tinstab il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li ma tinduċix is-CD86 f'livell ogħla mil-limitu pożittiv. Għal kull sessjoni, l-EC150 (konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tilħaq il-limitu pożittiv ta' CD86 ta' 150 %, ara l-paragrafu 19) tiġi kkalkolata jekk jiġi osservat rispons pożittiv għall-konċentrazzjoni tas-CD86. Meta s-sustanza kimika tat-test tinduċi rispons pożittiv għas-CD86 li ma jkunx relatat mal-konċentrazzjoni, il-kalkolu tal-EC150 jaf ma jkunx rilevanti kif deskritt fil-protokoll nru 183 (12) tad-DB-ALM tal-U-SENS™. Għal kull sessjoni, is-CV70 (konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tilħaq il-limitu ta' ċitotossiċità ta' 70 %, ara l-paragrafu 19) tiġi kkalkolata kull fejn possibbli (12). Biex jiġi investigat l-effett tar-rispons għal konċentrazzjoni ta' żieda fis-CD86, kwalunkwe konċentrazzjoni mill-konċentrazzjonijiet utilizzabbli għandha tingħażel eżatt f'nofs l-EC150 (jew l-ogħla konċentrazzjoni mhux ċitotossika negattiva tas-CD86) u s-CV70 (jew l-ogħla konċentrazzjoni awtorizzata, jiġifieri 200 µg/ml). Tal-anqas għandhom jiġu ttestjati 4 konċentrazzjonijiet għal kull sessjoni b'tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet li jkunu komuni għas-sessjoni(-jiet) preċedenti, għall-finijiet ta' tqabbil.

▼M8

15. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu użat fit-test U-SENS™ hu medium komplut (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli f'medium komplut) (ara l-paragrafu 4) jew 0,4 % DMSO f'medium komplut (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli fid-DMSO).

16. Il-kontroll pożittiv użat fit-test U-SENS™ hu TNBS (ara l-paragrafu 11), imħejji f'medium komplut. TNBS għandu jintuża bħala l-kontroll pożittiv għall-kejl tal-espressjoni ta' CD86 f'konċentrazzjoni waħda finali fil-pjastra (50 µg/ml) li trendi > 70 % tal-vijabbiltà taċ-ċelloli. Biex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 50 µg/ml ta' TNBS fil-pjastra, soluzzjoni ewlenija ta' 1 M (jiġifieri 293 mg/ml) ta' TNBS f'medium komplut titħejja u tkompli tiġi dilwita għal 2 930 darba b'medium komplut għal soluzzjoni għall-użu ta' 100 µg/ml. L-aċidu lattiku (LA, CAS 50-21-5) għandu jintuża bħala l-kontroll negattiv f'200 µg/ml solubilizzat f'medium komplut (minn soluzzjoni ewlenija ta' 0,4 mg/ml). F'kull pjastra ta' kull sessjoni, jitħejjew tliet repliki ta' kontroll mhux trattat ta' medium komplut, ta' kontroll b'solvent/b'veikolu, u ta' kontrolli negattivi u pożittivi (12). Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli. Il-kriterji ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni huma l-istess bħal dawk deskritti għas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 12).

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

17. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu jew is-soluzzjonijiet għall-użu deskritti fil-paragrafi 14-16 jitħalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mħejjija fil-pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (ara l-paragrafu 12). Imbagħad il-pjastri trattati jiġu inkubati għal 45±3 siegħa f'37°C f'5 % CO_2. Qabel l-inkubazzjoni, il-pjastri jiġu ssiġillati b'membrana semipermeabbli, biex jiġu evitati evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn ċelloli trattati bis-sustanzi kimiċi tat-test (12).

Tilwin taċ-ċelloli

18. Wara esponiment għal 45±3 siegħa, iċ-ċelloli jiġu trasferiti fi pjastra għall-mikrotitraġġ forma ta' V u jinġabru b'ċentfigurazzjoni. L-interferenza tas-solubbiltà hi definita bħala kristalli jew taqtiriet osservati taħt il-mikroskopju 45 ± 3 sigħat wara t-trattament (qabel it-tilwin taċ-ċelloli). Is-supernatanti jintremew u ċ-ċelloli li jifdal jinħaslu darba b'100 µl salina baferjata tal-fosfat (PBS) kiesħa silġ li jkun fiha 5 % serum tal-għoġġiela fetali (bafer tat-tilwin). Wara ċ-ċentrifugrazzjoni, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi b'100 µl bafer tat-tilwin u jitlewnu b'5 µl (eż. 0,25 µg) antikorpi anti-CD86 tikkettati bl-FITC jew tal-IgG1 (isotip) tal-ġrieden f'4°C għal 30 min protetti mid-dawl. Għandhom jintużaw l-antikorpi deskritti fil-protokoll nru 183 tad-DB-ALM ta' U-SENS™ (12) (għal CD86: BD-PharMingen #5556 57 Klonu: Fun-1, jew Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Klonu: BU63; u għal IgG1; BD-PharMingen #5557 48, jew Caltag/Invitrogen # GM4992). Fuq il-bażi tal-esperjenza tal-iżviluppaturi tat-test, l-intensità tal-fluworexxenza tal-antikorpi normalment tkun konsistenti bejn lottijiet differenti. Kloni oħra jew fornitur ieħor tal-antikorpi li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività jistgħu jintużaw għall-assaġġ (ara l-paragrafu 11). Madankollu, l-utenti jistgħu jikkunsidraw it-titrazzjoni tal-antikorpi fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju tagħhom stess biex jiddefinixxu l-aħjarkonċentrazzjoni għall-użu. Tista' tintuża sistema oħra ta' identifikazzjoni, eż. antikorpi anti-CD86 taggjati bil-fluworokromu, jekk jista' jintwera li din tipprovdi riżultati simili bħall-antikorpi konjugati bl-FITC, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Wara l-ħasil b'100 µl bafer tat-tilwin darbtejn u darba b'100 µl PBS kiesħa silġ, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'PBS kiesħa silġ (eż. 125 µl għal kampjuni li jiġu analizzati manwalment tubu, tubu, jew 50 µl bl-użu ta' pjastra tal-awtokampjunar) u tiżdied soluzzjoni tal-PI

▼M8

(konċentrazzjoni finali ta' 3 µg/ml). Jistgħu jintużaw markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, bħal 7-Amminoaċtinomiċina D (7-AAD) jew Tripan blu jekk it-tilwin alternattiv ikun jista' jintwera li jipprovdi riżultati simili bħall-PI, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2.

Analiżi taċ-ċitometrija tal-fluss

19. Il-livell ta' espressjoni tas-CD86 u l-vijabbiltà taċ-ċelloli jiġu analizzati bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss. Iċ-ċelloli jintwerew fi ħdan dot plot tad-daqs (FSC) u tal-granularità (SSC) stabbilita għall-iskala log biex tiġi identifikata biċ-ċar il-popolazzjoni fl-ewwel gate R1 u jiġu eliminati l-fdalijiet. Jinkiseb total fil-mira ta' 10 000 ċellola fil-gate R1 għal kull bwejra. Iċ-ċelloli mill-istess gate R1 jintwerew fi ħdan dot pot FL3 jew FL4 / SSC. Iċ-ċelloli vijabbli jiġu delineati billi titqiegħed it-tieni gate R2 li tagħżel il-popolazzjoni taċ-ċelloli negattivi għall-jodur tal-propidju (kanal FL3 jew FL4). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tista' tiġi kkalkolata bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja mill-programm ta' analiżi taċ-ċitometru. Meta l-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun baxxa, ikunu jistgħu jinkisbu sa 20 000 ċellola inklużi ċ-ċelloli mejtin. Inkella, id-*data* tista' tinkiseb għal minuta waħda wara t-tnedija tal-analiżi.

$$Vijabbiltà\ taċ-ċelloli = \frac{Numru\ ta'\ ċelloli\ ħajjin}{umber\ totali\ ta'\ ċelloli\ miksubin} \times 100$$

Imbagħad il-perċentwal ta' ċelloli pożittivi għall-FL1 jitkejjel fost dawn iċ-ċelloli vijabbli li jkunu ġew gated fl-R2 (fi ħdan l-R1). L-espressjoni tas-superfiċje taċ-ċeloli tas-CD86 tiġi analizzata f'dot plot FL1 / SSC li tkun gated fuq ċelloli vijabbli (R2).

Għall-medium komplut / għall-bwejriet tal-IgG1, il-markatur tal-analiżi jiġi stabbilit qrib il-popolazzjoni ewlenija biex il-kontrolli tal-medium komplut ikollhom IgG1 fi ħdan iż-żona fil-mira ta' 0,6 sa 0,9 %.

L-interferenza tal-kulur hi definita bħala ċaqliq tad-dot plot tal-IgG1 tikkettat bl-FITC (S.I. Ġeo Medju tal-FL1 tal-IgG1 ≥ 150 %).

L-indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tas-CD86 għaċ-ċelloli tal-kontrolli (mhux trattati jew f'0,4 % DMSO) u għaċ-ċelloli trattati b'sustanza kimika jiġi kkalkolat skont l-ekwazzjoni li ġejja:.

$$S.I. = \frac{\%\ taċ-ċelloli\ trattati\ bis-CD86^{+} - \%\ taċ-ċelloli\ trattati\ bl-IgG1^{+}}{\%\ taċ-ċelloli\ tal-kontroll\ bis-CD86^{+} \%\ taċ-ċelloli\ tal-kontroll\ bl-IgG1^{+}} \times 100$$

% taċ-ċelloli tal-kontroll mhux trattati bl-IgG1^{+}: imsejjaħ bħala l-perċentwal taċ-ċelloli IgG1 pożittivi għall-FL1 definiti bil-markatur tal-analiżi (medda aċċettata ta' ≥ 0,6 % u < 1,5 %, ara l-paragrafu 22) fost iċ-ċelloli mhux trattati vijabbli.

% taċ-ċelloli tal-kontroll/trattati bl-IgG1^{+}/CD86^{+}: imsejjaħ il-perċentwal ta' ċelloli IgG1/CD86 pożittivi għall-FL1 imkejjel mingħajr ma jiċċaqlaq il-markatur tal-analiżi fost iċ-ċelloli tal-kontroll/trattati vijabbli.

▼**M8**

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-*data*

20. Il-parametri li ġejjin huma kkalkolati fit-test U-SENS™: Il-valur tas-CV70, jiġifieri konċentrazzjoni li turi 70 % tas-sopravivenza taċ-ċelloli U937 (30 % ċitotossiċità) u l-valur tal-EC150, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha s-sustanzi kimiċi tat-test jinduċu indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tas-CD86 ta' 150 %.

Is-CV70 hi kkalkolata b'interpolazzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

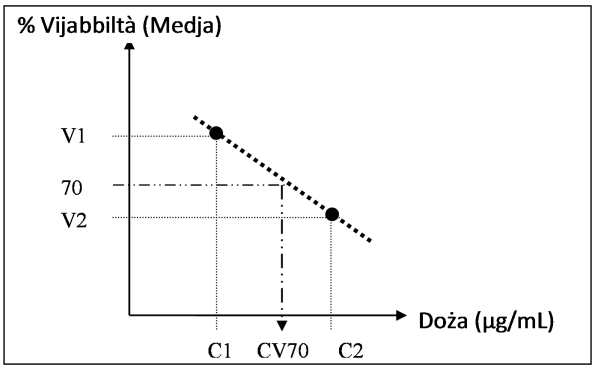
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

Fejn:

V1 hu l-valur minimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli ogħla minn 70 %

V2 hu l-valur massimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli anqas minn 70 %

C1 u C2 huma l-konċentrazzjonijiet li juru l-valur tal-vijabbiltà taċ-ċelloli V1 u V2 rispettivament.



Jistgħu jintużaw approċċi oħra biex tinkiseb is-CV70 dment li jintwera li dawn ma jkollhom ebda impatt fuq ir-riżultati (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza).

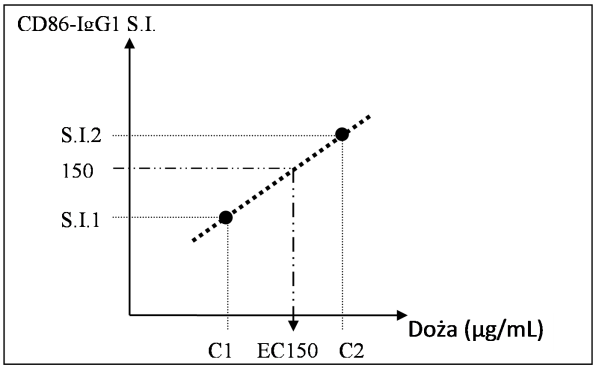
Is-EC150 hi kkalkolata b'interpolazzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

Fejn:

C1 hi l-ogħla konċentrazzjoni f'µg/ml b'CD86 S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 hi l-anqas konċentrazzjoni f'µg/ml b'CD86 S.I. ≥ 150 % (S.I. 2)



▼M8

Il-valuri tal-EC150 u tas-CV70 jiġu kkalkolati

— għal kull sessjoni: il-valuri individwali tal-EC150 u tas-CV70 jintużaw bħala għodod biex jiġi investigat l-effett ta' rispons għall-konċentrazzjoni taż-żieda ta' CD86 (ara l-paragrafu 14).

— fuq il-bażi tal-vijabbiltajiet medji, tiġi determinata s-CV70 ġenerali (12),

— fuq il-bażi tal-S.I. medju tal-valuri tas-CD86, l-EC150 ġenerali tiġi determinata għas-sustanza kimika tat-test prevista bħala POŻITTIVA bil-U-SENS™ (ara l-paragrafu 21) (12).

Mudell ta' tbassir

21. Għall-kejl tal-espressjoni tas-CD86, kull sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata f'tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet u f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti biex jinkiseb tbassir wieħed (NEGATTIV jew POŻITTIV).

— Il-konklużjoni individwali ta' sessjoni ta' U-SENS™ titqies NEGATTIVA (minn hawn 'il quddiem imsejħa N) jekk l-S.I. tas-CD86 ikun anqas minn 150 % fil-konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi kollha (vijabbiltà taċ-ċelloli $\geq$ 70 %) u jekk ma tiġi osservata ebda interferenza (ċitotossiċità, solubbiltà: ara l-paragrafu 18 jew kulur: ara l-paragrafu 19 indipendentement mill-konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi li fihom tiġi individwata l-interferenza. Fil-każijiet l-oħra kollha: S.I. ta' CD86 ta' 150 % jew ogħla u/jew interferenzi osservati, il-konklużjoni individwali ta' sessjoni ta' U-SENS™ titqies Pożittiva (minn hawn 'il quddiem imsejħa P).

— Tbassir ta' U-SENS™ jitqies NEGATTIV jekk tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti jiġu negattivi (N) (Figura 1). Jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu negattivi (N), it-tbassir ta' U-SENS™ jitqies NEGATTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni.

— Tbassir ta' U-SENS™ jitqies POŻITTIV jekk tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti jiġu pożittivi (P) (Figura 1). Jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu pożittivi (P), it-tbassir ta' U-SENS™ jitqies POŻITTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni.

— Peress li ma jsirx assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża, hemm eċċezzjoni jekk, fl-ewwel sessjoni, l-S.I. ta' CD86 ikun 150 % jew akbar fl-ogħla konċentrazzjoni mhux ċitotossika biss. Imbagħad is-sessjoni titqies MHUX KONKLUŻIVA (NC), u konċentrazzjonijiet addizzjonali (bejn l-ogħla konċentrazzjoni mingħajr ċitotossiċità u l-anqas konċentrazzjoni ta' ċitotossiċità - ara l-paragrafu 20) għandhom jiġu ttestjati f'sessjonijiet addizzjonali. F'każ li sessjoni tiġi identifikata bħala NC, tal-anqas għandhom isiru żewġ sessjonijiet addizzjonali, u r-raba' sessjoni f'każ li t-tieni u t-tielet sessjonijiet ma jkunux jaqblu (N u/jew P indipendentement) (Figura 1). Sessjonijiet ta' segwitu jitqiesu pożittivi anki jekk konċentrazzjoni ċitotossika waħda biss tagħti CD86 ta' 150 % jew aktar, peress li l-issettjar tal-konċentrazzjoni ġie aġġustat għas-sustanza kimika tat-test speċifika. It-tbassir finali jkun ibbażat fuq ir-riżultat tal-maġġoranza tat-tliet jew tal-erba' sessjonijiet individwali (jiġifieri tnejn minn tlieta jew tnejn minn erbgħa) (Figura 1).

▼**M8**

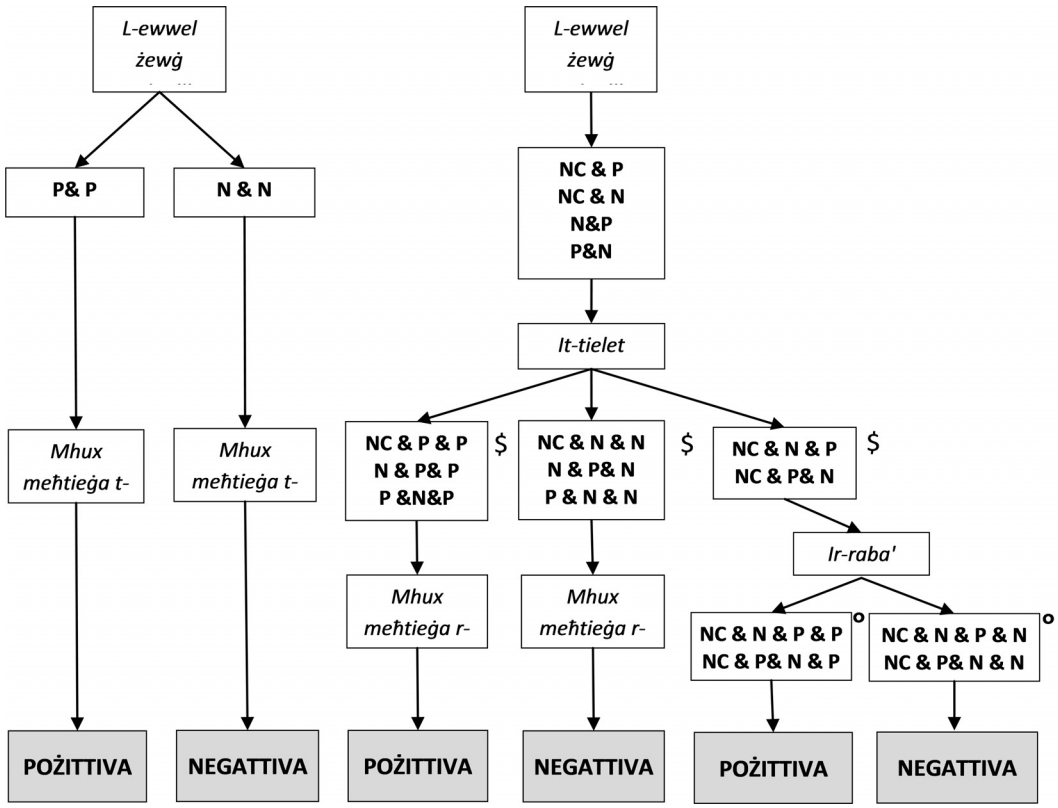


Figura 1: Mudell ta' tbassir użat fit-test U-SENS™ Tbassir U-SENS™ għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjoni tal-paragrafu 4 u tal-paragrafi 7, 8 u 9 tal-Introduzzjoni ġenerali.

N: Sessjoni b'ebda CD86 pożittiv jew interferenza osservati;

P: Sessjoni b'CD86 pożittiv jew interferenza/i osservati;

NC: Mhux Konklużiva. L-ewwel sessjoni b'Ebda Konklużjoni meta s-CD86 ikun pożittiv fl-ogħla konċentrazzjoni mhux ċitotossika biss;

#: Konklużjoni individwali Mhux Konklużiva (NC) attribwita biss għall-ewwel sessjoni twassal b'mod awtomatiku għall-ħtieġa li ssir it-tielet sessjoni biex tintlaħaq maġġoranza ta' konklużjonijiet Pożittivi (P) jew Negattivi (N) f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti minn tlieta.

$: #Il-kaxex juru t-taħlitiet rilevanti ta' riżultati mit-tliet sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel żewġ sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq.

°: #Il-kaxex juru t-taħlitiet rilevanti ta' riżultati mill-erba' sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel tliet sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq.

Kriterji ta' aċċettazzjoni

22. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża t-test U-SENS™ (12).

— Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment ta' 45±3 sigħat, il-vijabbiltà medja taċ-ċelloli U937 mhux trattati fi triplikat kellha tkun > 90 % u ma tiġi osservata ebda deriva fl-espressjoni tas-CD86. L-espressjoni bażali tas-CD86 ta' ċelloli U937 mhux trattati kellha taqa' fi ħdan il-medda ta' ≥ 2 % u ≤ 25 %.

▼M8

— Meta jintuża DMSO bħala solvent, il-validità tal-kontroll b'veikolu DMSO tiġi vvalutata bil-kalkolu tal-S.I. ta' DMSO meta mqabbel ma' ċelloli mhux trattati, u l-vijabbiltà medja taċ-ċelloli triplikati kellha tkun > 90 %. Il-kontroll b'veikolu DMSO jkun validu jekk il-valur medju tal-S.I. tas-CD86 fi triplikat tiegħu jkun iżgħar minn 250 % tal-medja tal-S.I. as-CD86 fi triplikat taċ-ċelloli U937 mhux trattati.

— Is-sessjonijiet jitqiesu validi jekk tal-anqas tnejn minn tliet valuri tal-IgG1 taċ-ċelloli U937 mhux trattati jaqgħu fi ħdan il-medda ta' ≥ 0,6 % u < 1,5 %.

— Il-kontroll negattiv (aċidu lattiku) ittestjat b'mod konkorrenti jitqies validu jekk tal-anqas tnejn mit-tliet repliki jkunu negattivi (S.I. tas-CD86 < 150 %) u mhux ċitotossiċi (vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 70 %).

— Il-kontroll pożittiv (TNBS) jitqies validu jekk tal-anqas tnejn mit-tliet repliki jkunu pożittivi (S.I. tas-CD86 ≥ 150 %) u mhux ċitotossiċi (vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 70 %).

Rapport tat-test

23. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja.

Sustanza Kimika tat-Test

Sustanza monokostitwenti

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà f'medium komplut, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ṫhin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita:

— Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà f'medium komplut, is-solubbiltà fid-DMSO, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ṫhin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

▼**M8**

Kontrolli

Kontroll pożittiv

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv u b'solvent/b'veikolu

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintuża solvent/veikolu ieħor li ma jkunx fost dawk imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tat-test użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-faċilità mnejn inkisbet);

— Iċ-ċitometrija tal-fluss użata (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrumenti, l-antikorpi u l-markatur taċ-ċitotossiċità użat;

— Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tat-test bl-ittestjar ta' sustanzi ta' profiċjenza, u l-proċedura użata biex tintwera prestazzjoni riproduċibbli tat-test maż-żmien, eż. *data* storika tal-kontroll u/jew *data* storika tal-kontrolli tar-reattività.

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test

— Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tal-S.I. tas-CD86 miksuba bil-kontroll b'solvent/b'veikolu meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;

▼**M8**

— Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tas-S.I. miksuba bil-kontroll pożittiv meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;

— Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-konċentrazzjonijiet ittestjati kollha tas-sustanza kimika tat-test.

Il-proċedura tat-test

— In-numru ta' sessjonijiet użati;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika, l-applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment użat (jekk ikun differenti minn dak rakkomandat)

— Id-durata tal-esponiment;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

— Tabulazzjoni tad-*data*, inkluži s-CV70 (jekk applikabbli), l-S.I., il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, il-valuri tal-EC150 (jekk applikabbli) miksuba għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontroll pożittiv f'kull sessjoni, u indikazzjoni tal-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont il-mudell tat-tbassir;

— Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-Riżultati

— Diskussjoni tar-riżultati miksuba bit-test U-SENS™;

— Kunsiderazzjoni tar-riżultati tat-test fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dan huwa disponibbli mis-sit web li ġej: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Disponibbli fuq: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Disponibbli fuq: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.-*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/-MONO(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Dan huwa disponibbli mis-sit web li ġej: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) In-Nazzjonijiet Uniti (2015) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Disponibbli fuq: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

Appendiċi 2.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (14).

AOP (Perkors tal-Eżitu Avvers): sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (15).

Rispons għall-konċentrazzjoni tas-CD86: Hemm dipendenza tal-konċentrazzjoni (jew rispons għall-konċentrazzjoni) meta konċentrazzjoni pożittiva (S.I. tas-CD86 ≥ 150) tkun segwita minn konċentrazzjoni b'S.I. li jiżdied tas-CD86.

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew taħlita

CV70: Il-konċentrazzjoni stmata li turi vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 70 %.

Deriva: Deriva hi definita i) mill-valur ikkoreġut tal-%$CD86^+$ tar-replika tal-kontroll mhux trattat 3 ikun anqas minn 50 % tal-medja tal-valur ikkoreġut tal-%$CD86^+$ tar-repliki tal-kontroll mhux trattat 1 u 2; u ii) mill-valur ikkoreġut tal-%$CD86^+$ tar-replika tal-kontroll negattiv 3 ikun anqas minn 50 % tal-medja tal-valur ikkoreġut tal-%$CD86^+$ tar-repliki tal-kontroll negattiv 1 u 2.

EC150: il-konċentrazzjonijiet stmati li juru l-S.I. ta' 150 % tal-espressjoni tas-CD86.

Ċitometrija tal-fluss: teknika ċitometrika li fiha ċ-ċelloli sospiżi fi fluwidu jiffluwixxu waħda, waħda permezz ta' fokus ta' dawl tal-eċitament, li jitferrex f'mudelli karatteristiċi għaċ-ċelloli u għall-komponenti tagħhom; iċ-ċelloli spiss jiġu tikkettati b'markaturi fluworexxenti biex id-dawl l-ewwel jiġi assorbit imbagħad jinħeles fi frekwenzi differenti.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), għall-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew għall-valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-ħtieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

▼**M8**

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Preapteni: sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika, eż. permezz ta' ossidazzjoni.

Proapteni: sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jeħilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (14).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorarji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (14).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

S.I.: Indiċi ta' Stimolazzjoni. Valuri relattivi tal-intensità medja ġeometrika tal-fluworexxenza f'ċelloli trattati bis-sustanza kimika meta mqabbla ma' ċelloli trattati b'solvent.

Kontroll b'solvent/veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test ħlief tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bażi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbliment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

Bafer tat-tilwin: Salina baferjata bil-fosfat li fiha 5 % serum tal-għoġġiela fetali.

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan it-test.

▼**M8**

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (16).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Test validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (18).

▼**M8**

Appendiċi 2.2

SUSTANZI TA' PROFIĊJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu b'mod korrett it-tbassir mistenni ta' U-SENS™ għall-10 sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri tas-CV70 u tal-EC150 li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza. Is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bit-test U-SENS™. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għat-test U-SENS™ (1) (8).

Tabella 1

Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bit-test U-SENS™

Sustanzi ta' profiċjenza	CASRN	Stat fiżiku	Tbassir *in vivo* (1)	U-SENS Solvent/ Veikolu	U-SENS Medda ta' Riferiment ta' CV70 f'µg/ml (2)	U-SENS Medda ta' Riferiment ta' EC150 f'µg/ml (2)
4-Fenilenediammina	106-50-3	Solidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	Medium komplut (3)	<30	Pożittiv (≤10)
Aċidu sulfoniku pikril	2508-19-2	Likwidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	Medium komplut	>50	Pożittiv (≤50)
Dietilmaleat	141-05-9	Likwidu	Sensitizzatur (moderat)	DMSO	10-100	Pożittiv (≤20)
Resorċinol	108-46-3	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	Medium komplut	>100	Pożittiv (≤50)
Alkoħol ċinnamiku	104-54-1	Solidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	DMSO	>100	Pożittiv (10-100)
4-Allilanisol	140-67-0	Likwidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	DMSO	>100	Pożittiv (<200)
Sakkarina	81-07-2	Solidu	Mhux sensitizzatur	DMSO	>200	Negattiv (>200)
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Medium komplut	>200	Negattiv (>200)
Aċidu lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Medium komplut	>200	Negattiv (>200)
Aċidu saliċiliku	69-72-7	Solidu	Mhux sensitizzatur	DMSO	>200	Negattiv (>200)

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

(1) It-tbassir tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* hu bbażat fuq *data* tal-LLNA (1) (8). Il-potenza *in vivo* tinkiseb tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (17).

(2) Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (1) (8).

(3) Medium komplut: Medium RPMI-1640 supplimentat b'10 % serum tal-għoġġiela fetali, 2 mM L-glutammina, 100 unità/ml penicillina u 100 µg/ml steptomiċina (8).

▼**M8**

Appendiċi 3

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: ASSAĠĠ IL-8 LUC

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. Għall-kuntrarju ta' assaġġi li janalizzaw l-espressjoni ta' markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli, l-assaġġ IL8-Luc jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-IL-8, ċitokina assoċjata mal-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi (DC). Fil-linja ta' ċelloli indikatur IL-8 derivata mit-THP-1 (THP-G8, stabbilita mil-linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika akuta umana THP-1), l-espressjoni tal-IL-8 titkejjel wara l-esponiment għal sensitizzaturi (1). Imbagħad l-espressjoni tal-luċiferaži tintuża biex tgħin fid-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.

2. L-assaġġ IL-8 ġie evalwat fi studju ta' validazzjoni (2) imwettaq mill-Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (JaCVAM), mill-**Ministeru tal-Ekonomija, tal-Kummerċ u tal-Industrija** (METI), u mill-Japanese Society **for Alternatives to Animal Experiments (JSAAE**) u mbagħad ġie soġġett għal rieżami bejn il-pari indipendenti (3) taħt l-awspiċji tal-JaCVAM u tal-Ministeru tas-Saħħa, tax-Xogħol u tas-Sigurtà Soċjali (MHLW) bl-appoġġ tal-**International Cooperation on Alternative Test** Methods (ICATM). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, l-assaġġ IL-8 LUC hu meqjus siewi bħala parti minn IATA għad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini ta' klassifikazzjoni u ta' tikkettar tal-perikli. Eżempji tal-użu tad-*data* tal-assaġġ IL-8 Luc flimkien ma' informazzjoni oħra huma rapportati fid-dokumentazzjoni (4) (5) (6).

3. L-assaġġ IL-8 Luc wera li kien trasferibbli għal laboratorji esperjenzati fil-koltura taċ-ċelloli u fil-ġestjoni tal-luċiferaži. Ir-riproduċibbiltajiet fi ħdan u bejn il-laboratorji kienu ta' 87,7 % u ta' 87,5 %, rispettivament (2). *Data* ġenerata fl-istudju ta' validazzjoni (2) u xogħol ippubblikat ieħor (1) (6) turi li kontra l-LLNA, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 118 minn 143 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u ġġudika 25 sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza tal-assaġġ IL-8 Luc fid-distinzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda (Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi (Ebda Kat. tal-GHS tan-NU/tas-CLP) hi ta' 86 % (101/118) b'sensittività ta' 96 % (92/96) u bi speċifiċità ta' 41 % (9/22). Eskluži sustanzi li jaqgħu barra d-dominju ta' applikabbiltà deskritt hawn taħt (paragrafu 5), l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 113 minn 136 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u ġġudika 23 sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza tal-assaġġ IL-8 Luc hi ta' 89 % (101/103) b'sensittività ta' 96 % (92/96) u bi speċifiċità ta' 53 % (9/17). Bl-użu tad-*data* umana ċċitata f'Urbisch et al. (7), l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 76 minn 90 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u ġġudika 14-il sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza hi ta' 80 % (61/76) is-sensittività hi ta' 93 % (54/58) u l-ispeċifiċità hi ta' 39 % (7/18). Eskluži sustanzi li jaqgħu barra d-dominju ta' applikabbiltà, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 71 minn 84 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u ġġudika 13-il sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza hi ta' 86 % (61/71) b'sensittività ta' 93 % (54/58) u bi speċifiċità ta' 54 % (7/13). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz bl-assaġġ IL-8 Luc għandhom probabbiltà akbar li jseħħu b'sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa/moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn dawk b'potenza għolja (subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (6). F'daqqa, l-informazzjoni ssostni rwol għall-assaġġ IL-8 Luc fl-identifikazzjoni ta' perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-akkuratezza mogħtija għall-assaġġ IL-8 Luc bħala test waħdu hi indikattiva biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati testijiet

▼**M8**

mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li l-LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li l-assaġġ IL-8 Luc hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' mekkaniżmi ta' reazzjoni, ta' potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u ta' proprjetajiet fiżikokimiċi (2) (6).

5. Għalkemm l-assaġġ IL-8 Luc juża X-VIVO™ 15 bħala solvent, hu evalwa korrettament sustanzi kimiċi b'Log K_{ow} >3,5 u dawk b'solubbiltà fl-ilma ta' madwar 100 μg/ ml kif ikkalkolati b'EPI Suite™ u l-prestazzjoni tiegħu biex jindividwa sensitizzaturi b'solubbiltà batuta fl-ilma hi aħjar minn dik tal-assaġġ IL-8 Luc bl-użu tas-sulfossidu tad-dimetil (DMSO) bħala solvent (2). Madankollu, riżultati negattivi għas-sustanzi kimiċi tat-test li mhumiex dissolti f'20 mg/ml jistgħu jipproduċu riżultati ta' negattivi foloz minħabba n-nuqqas ta' ħila tagħhom li jiddisolvu f'X-VIVO™ 15. Għaldaqstant, riżultati negattivi għal dawn is-sustanzi kimiċi ma għandhomx jiġu kkunsidrati. Fl-istudju ta' validazzjoni ġiet osservata rata għolja ta' negattivi foloz għall-anidridi. Barra minn hekk, minħabba l-kapaċità metabolika limitata tal-linja ta' ċelloli (8) u l-kundizzjonijiet esperimentali, il-proapteni (sustanzi li jeħtieġu attivazzjoni metabolika) u l-preapteni (sustanzi attivati bl-ossidazzjoni tal-arja) jistgħu jagħtu riżultati negattivi fl-assaġġ. Madankollu, għalkemm ir-riżultati negattivi għal pre/proapteni suspettati għandhom jiġu interpretati b'attenzjoni, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika korrettament 11 minn 11-il preapten, 6/6 proapteni, u 6/8 pre/proapteni fis-sett ta' *data* tal-assaġġ IL-8 Luc (2). Fuq il-bażi tar-rieżami komprensiv riċenti fuq tliet testijiet mhux fuq l-annimali (id-DPRA, il-KeratinoSens™ u l-h-CLAT) biex jiġu individwati pre u proapteni (9), u fuq il-bażi tal-fatt li ċ-ċelloli THP-G8 użati fl-assaġġ IL-8 Luc huma linja ta' ċelloli derivata mit-THP-1 li tintuża fl-h-CLAT, l-assaġġ IL-8 Luc jista' jikkontribwixxi wkoll biex tiżdied is-sensittività ta' testijiet mhux fuq l-annimali biex jindividwaw pre u proapteni fit-taħlita ta' testijiet oħra. It-tensjoattivi ttestjati s'issa taw riżultati pożittivi (foloz) indipendentement mit-tip tagħhom (eż. katjoniċi, anjoniċi jew nonjoniċi). Finalment sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-luċiferaži jistgħu jħawdu l-attività/il-kejl tagħha, u jikkawżaw inibizzjoni apparenti jew luminexxenza akbar (10). Pereżempju, konċentrazzjonijiet ta' fitoestroġenu akbar minn 1μM ġew rapportati li jinterferixxu ma' sinjali ta' luminexxenza f'assaġġi oħra tal-ġene indikatur abbaži tal-luċiferaži minħabba sovrattivazzjoni tal-ġene indikatur tal-luċiferaži. Bħala konsegwenza, l-espressjoni tal-luċiferaži miksuba f'konċentrazzjonijiet għoljin ta' fitoestroġeni jew ta' komposti suspettati li jipproduċu attivazzjoni simili għall-fitoestroġenu tal-ġene indikatur tal-luċiferaži trid tiġi eżaminata bir-reqqa (11). Fuq il-bażi ta' dan li ntqal hawn fuq, tensjoattivi, anidridi u sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-luċiferaži jaqgħu barra mid-dominju ta' applikabbiltà ta' dan l-assaġġ. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tal-assaġġ IL-8 Luc għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, it-test ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

6. Kif deskritt aktar 'il fuq, l-assaġġ IL-8 Luc isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Hu meħtieġ aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' *data* umana, biex jiġi determinat jekk ir-riżultati tal-IL-8 Luc jistgħux jikkontribwixxu għall-valutazzjoni tal-potenza meta meqjusa flimkien ma' sorsi ta' informazzjoni oħra.

▼**M8**

7. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 3.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

8. L-assaġġ IL-8 jagħmel użu minn linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana THP-1 li nkisbet mingħand l-American Type Culture Collection (Manassas, VA, l-Istati Uniti). Bl-użu ta' din il-linja ta' ċelloli, id-Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine, stabbilixxa linja ta' ċelloli indikatur tal-IL-8 derivata mit-THP-1, THP-G8, li tħaddan fiha l-ġeni tal-luċiferaži Luċiferaži Stabbli Oranġjo (SLO) u l-Luċiferaži Stabbli Ħamra (SLR) taħt il-kontroll tal-IL-8 u promoturi tal-**gliċeraldeid 3-fosfat deidroġenasi** (GAPDH), rispettivament (1). Dan jippermetti l-kejl kwantitattiv tal-induzzjoni tal-ġeni tal-luċiferaži bid-detezzjoni tal-luminexxenza minn substrati tal-luċiferaži ferm stabbiliti li jipproduċu d-dawl bħala indikatur tal-attività tal-IL-8 u tal-GAPDH fiċ-ċelloli wara l-esponiment għal sustanzi kimiċi sensitizzanti.

9. Is-sistema ta' assaġġ b'kulur doppju tinvolvi luċiferaži li temetti l-oranġjo (SLO; λmass = 580 nm) (12) għall-espressjoni ġenika tal-promotur tal-IL-8 kif ukoll luċiferaži li temetti l-aħmar (SLR; λmass = 630 nm) (13) għall-espressjoni ġenika tal-promotur tal-kontroll intern, GAPDH. Iż-żewġ luċiferažijiet jemettu kuluri differenti malli jirreaġixxu mal-luċiferina-d tal-fireflies u l-luminexxenza tagħhom titkejjel b'mod simultanju f'reazzjoni bi stadju wieħed billi l-emissjoni tiġi diviża mit-taħlita tal-assaġġ bl-użu ta' filtru ottiku (14) (Appendiċi 3.2).

10. Iċ-ċelloli THP-G8 huma trattati għal 16-il siegħa bis-sustanza kimika tat-test, u wara dan jitkejlu l-attività tal-luċiferaži tal-SLO (SLO-LA) li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8 u l-attività tal-luċiferaži tal-SLR (SLR-LA) li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH. Biex l-abbrevjazzjonijiet ikunu jistgħu jinftiehmu faċilment, SLO-LA u SLR-LA huma msemmija IL8LA u GAPLA, rispettivament. It-Tabella 1 tagħti deskrizzjoni tat-termini assoċjati mal-attività tal-luċiferaži fl-assaġġ IL-8 Luc. Il-valuri mkejla jintużaw biex tiġi kkalkolata l-IL8LA normalizzata (nIL8LA), li hi l-proporzjon tal-IL8LA għall-GAPLA; l-induzzjoni tal-nIL8LA (Ind-IL8LA), li hi l-proporzjon tal-medji aritmetiċi tal-valuri mkejla kwadrupli tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanza kimika tat-test u l-valuri tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 mhux trattati; u l-inibizzjoni tal-GAPLA (inh-GAPLA), li hi l-proporzjon tal-medji aritmetiċi tal-valuri mkejla kwadrupli tal-GAPLA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanza kimika tat-test u l-valuri tal-GAPLA taċ-ċelloli THP-G8 mhux trattati, u użati bħala indikatur għaċ-ċitotossiċità.

Tabella 1

Deskrizzjoni tat-termini assoċjati mal-attività tal-luċiferaži fl-assaġġ IL-8 Luc

Abbrevjazzjonijiet	Definizzjoni
GAPLA	Attività ta' luċiferaži tal-SLR li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH
IL8LA	Attività ta' luċiferaži tal-SLO li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi / nIL8LA taċ-ċelloli mhux trattati

▼**M8**

Abbrevjazzjonijiet	Definizzjoni
Inh-GAPLA	GAPLA tat-THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi / GAPLA taċ-ċelloli mhux trattati
CV05	L-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li fiha Inh-GAPLA ssir < 0,05.

11. L-istandards tal-prestazzjoni (PS) (15) huma disponibbli biex tiġi faċilitata l-validazzjoni tat-testijiet modifikati *in vitro* tal-luċiferaži tal-IL-8 simili għall-assaġġ IL-8 Luc u jippermettu l-emendar fil-ħin tal-Linja Gwida tat-Test 442E tal-OECD għall-inklużjoni tagħhom. Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* (MAD) mill-OECD se tkun garantita biss għal testijiet validati skont il-PS, jekk dawn it-testijiet ikunu ġew rieżaminati u inklużi fil-Linja Gwida tat-Test 442E mill-OECD (16).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

12. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 bħala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 3.3 f'konformità mal-Prattiki Tajba tal-Metodi *in vitro* (11). Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* ġenerata bil-kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 15) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 21-24), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

PROĊEDURA

13. Il-Proċedura Operattiva Standard (SOP) għall-assaġġ IL-8 Luc hi disponibbli u għandha titħaddem meta jitwettaq it-test (18). Il-laboratorji li lesti li jwettqu t-test jistgħu jiksbu l-linja ta' ċelloli rikombinanti THP-G8 mill-GPC Lab. Co. Ltd.,Tottori, il-Ġappun, wara li jiffirmaw Ftehim ta' Trasferiment tal-Materjal (MTA) f'konformità mal-kundizzjonijiet tal-mudell tal-OECD. Il-paragrafi li ġejjin jipprovdu deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin tal-assaġġ.

Thejjija taċ-ċelloli

14. Il-linja ta' ċelloli THP-G8 mill-GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, il-Ġappun, għandha tintuża għat-twettiq tal-assaġġ IL-8 Luc (ara l-paragrafi 8 u 13). Malli jiġu riċevuti, iċ-ċelloli jiġu propagati (2-4 passiġġieri) u jinħażnu ffriżati bħala stokk omoġenu. Iċ-ċelloli minn dan l-istokk jistgħu jiġu propagati sa massimu ta' 12-il passaġġ jew sa massimu ta' 6 ġimgħat. Il-medium użat għall-propagazzjoni hu l-medium tat-tkabbir RPMI-1640 li fih 10 % serum tal-bovini fetali (FBS), soluzzjoni antibijotika/antimikotika (100U/ml peniċillina G, 100µg/ml streptomiċina u 0,25µg/ml amfoteriċina B f'0,85 % salina) (eż. GIBCO Cat#15240-062), 0,15µg/ml Puromiċina (eż. CAS:58-58-2) u 300µg/ml G418 (eż. CAS:108321-42-2).

15. Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, iċ-ċelloli għandhom jiġu kwalifikati billi jsir kontroll tar-reattività. Dan il-kontroll għandu jsir ġimgħa/ġimagħtejn jew 2-4 passaġġi wara t-tħlil, bl-użu tal-kontroll pożittiv, 4-nitrobenżil bromur (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99 % purità) u l-kontroll negattiv, aċidu lattiku (LA) (CAS:50-21-5, ≥85 % purità). 4-NBB għandu jipproduċi rispons pożittiv għall-Ind-IL8LA (≥1,4), filwaqt li l-LA għandu jipproduċi rispons negattiv għall-Ind-IL8LA (<1,4). Huma biss iċ-ċelloli li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività li jintużaw għall-assaġġ. Il-kontroll għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 22-24.

▼M8

16. Għall-ittestjar, iċ-ċelloli THP-G8 jinżergħu f'densità ta' 2 sa 5×10^5 ċelloli/ml, u jiġu prekolturati fi flasks tal-koltura għal għal 48 sa 96 siegħa. Fil-jum tat-test, iċ-ċelloli miġbura mill-flask tal-koltura jinħaslu bl-RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS mingħajr ebda antibijotiku, u mbagħad jerġgħu jiġu sospiżi b'RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS mingħajr ebda antibijotiku f'1×10^6 ċelloli/ml. Imbagħad, iċ-ċelloli jitqassmu fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (eż. Costar Cat#3603) b'50µl (5×10^4 ċelloli/bwejra).

Thejjija tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

17. Is-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jitħejjew dakinhar tal-ittestjar. Għall-assaġġ IL-8 Luc, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti f'X-VIVO™ 15, medium ħieles mis-serum disponibbli kummerċjalment (Lonza, 04-418Q), għall-konċentrazzjoni finali ta' 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 jiżdied ma' 20 mg tas-sustanza kimika tat-test (indipendentement mis-solubbiltà tas-sustanza kimika) f'tubu tal-mikroċentrifugazzjoni u jinġieb għal volum ta' 1ml u mbagħad jiġi vortiċifikat bis-saħħa u jitħawwad fuq rotor b'veloċità massima ta' 8 rpm għal 30 min f'temperatura ambjentali ta' madwar 20°C. Barra minn hekk, jekk is-sustanzi kimiċi solidi jibqgħu insolubbli, it-tubu jiġi sonikat sakemm is-sustanza kimika tiddisolvi kompletament jew tiġi dispersa b'mod stabbli. Għal sustanzi kimiċi tat-test solubbli f'X-VIVO™ 15, is-soluzzjoni tiġi dilwita b'fattur ta' 5 b'X-VIVO™ 15 u tintuża bħala soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanza kimika tat-test (4 mg/ml). Għal sustanzi kimiċi tat-test mhux solubbli f'X-VIVO™ 15, it-taħlita terġa' tiġi rotata għal tal-anqas 30 min, u mbagħad ċentrifugata fi 15,000 rpm (≈20000*g*) għal 5 min; is-supernatant li jirriżulta jintuża bħala soluzzjoni ewlenija X-VIVO™ 15 tas-sustanza kimika tat-test. Għandha tiġi pprovduta motivazzjoni xjentifika għall-użu ta' solventi oħra, bħal DMSO, ilma, jew il-medium tat-tkabbir. Il-proċedura dettaljata għad-dissoluzzjoni tas-sustanzi kimiċi hi murija fl-Appendiċi 3.5. Is-soluzzjonijiet ta' X-VIVO™ 15 deskritti fil-paragrafi 18-23 jitħalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mħejjija fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (ara l-paragrafu 16).

18. L-ewwel sessjoni tat-test għandha l-għan li tiddetermina l-konċentrazzjoni ċitotossika u li teżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Bl-użu ta' X-VIVO™ 15, id-dilwizzjonijiet serjali tas-soluzzjonijiet ewlenin ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanzi kimiċi tat-test isiru b'fattur ta' dilwizzjoni ta' tnejn (ara l-Appendiċi 3.5) bl-użu ta' blokk tal-assaġġ b'96 bwejra (eż. Costar Cat#EW-01729-03). Imbagħad, 50 µl/bwejra tas-soluzzjoni dilwita tiżdied ma' 50 µl tas-sospensjoni taċ-ċelloli fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. B'hekk, għal sustanzi kimiċi tat-test li huma solubbli f'X-VIVO ™ 15, il-konċentrazzjonijiet finali tas-sustanzi kimiċi tat-test ivarjaw minn 0,002 sa 2 mg/ml (Appendiċi 3.5). Għal sustanzi kimiċi tat-test li mhumiex solubbli f'X-VIVO ™ 15 f'20 mg/ml, fatturi ta' dilwizzjoni li jvarjaw minn 2 sa 2^{10} biss jiġu determinati, għalkemm il-konċentrazzjonijiet finali attwali tas-sustanzi kimiċi tat-test jibqgħu inċerti u jiddipendu mill-konċentrazzjoni saturata tas-sustanzi kimiċi tat-test fl-X-VIVO ™ 15.

19. F'sessjonijiet tat-test sussegwenti (jiġifieri t-tieni, it-tielet u r-raba' repliki), is-soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ issir fil-konċentrazzjoni 4 darbiet ogħla mill-konċentrazzjoni tal-vijabbiltà taċ-ċelloli 05 (CV05; l-anqas konċentrazzjoni li fiha l-Inh-GAPLA ssir < 0,05) fl-ewwel esperiment. Jekk Inh-GAPLA ma tonqosx f'livell anqas minn 0,05 fl-ogħla konċentrazzjoni fl-ewwel sessjoni, is-soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ 15 issir fl-ogħla konċentrazzjoni tal-ewwel sessjoni. Il-konċentrazzjoni ta' CV05 tiġi kkalkolata bid-diviżjoni tal-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija fl-ewwel sessjoni b'fattur ta' dilwizzjoni għas-CV05 (X) (fattur ta' dilwizzjoni CV05 (X); il-fattur ta' dilwizzjoni meħtieġ biex tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija għas-CV05) (ara l-Appendiċi 3.5). Għal sustanzi tat-test mhux solubbli f'X-VIVO f'20 mg/ml, is-CV05 tiġi determinata bil-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija × 1/X. Għas-sessjonijiet 2 sa 4, it-tieni soluzzjoni ewlenija titħejja bħala 4 × CV05 (Appendiċi 3.5).

▼M8

20. Dilwizzjonijiet serjali tat-tieni soluzzjonijiet ewlenin ta' X-VIVO™ 15 jitħejjew b'fattur ta' dilwizzjoni ta' 1,5 bl-użu ta' blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Imbagħad, 50 µl/bwejra tas-soluzzjoni dilwita tiżdied ma' 50 µl tas-sospensjoni taċ-ċelloli fil-bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. Kull konċentrazzjoni ta' kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Imbagħad il-kampjuni jitħalltu fuq xejker tal-pjastri u jiġu inkubati għal 16-il siegħa f'37°C u f'5 % CO_2, u wara dan titkejjel l-attività tal-luċiferaži kif deskritt hawn taħt.

21. Il-kontroll b'solvent hu t-taħlita ta' 50 µl/bwejra ta' X-VIVO™ 15 u 50 µl/bwejra ta' sospensjoni taċ-ċelloli fl-RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS.

22. Il-kontroll pożittiv rakkomandat hu 4-NBB. 20 mg ta' 4-NBB jitħejja f'tubu tal-mikrofuġju ta' 1,5-ml, li miegħu jiżdied sa 1 ml X-VIVO™ 15. It-tubu jiġi vorticifikat bis-saħħa u jitħawwad fuq rotor b'veloċità massima ta' 8 rpm għal tal-anqas 30 min. Wara ċ-ċentrifugazzjoni f'20000g għal 5 min, is-supernatant jiġi dilwit b'fattur ta' 4 b'X-VIVO™ 15, u 500 µl tas-supernatant dilwit jiġi trasferit fi bwejra fi blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Is-supernatant dilwit jiġi dilwit aktar b'X-VIVO™ 15 f'fatturi ta' 2 u 4, u tiżdied 50 µl tas-soluzzjoni ma' 50 µl tas-sospensjoni taċ-ċelloli THP-G8 fil-bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċat b'96 bwejra (Appendiċi 3.6). Kull konċentrazzjoni tal-kontroll pożittiv għandha tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Il-pjastra titheżżeż fuq xejker tal-pjastri, u tiġi inkubata f'inkubatur tas-CO_2 għal 16-il siegħa (37°C, 5 % CO_2), u wara dan l-attività tal-luċiferaži titkejjel kif deskritt fil-paragrafu 29.

23. Il-kontroll negattiv rakkomandat hu l-LA. 20 mg LA mħejji f'tubu tal-mikrofuġju ta' 1,5-ml, li miegħu jiżdied sa 1 ml (20 mg/ ml) X-VIVO™ 15. Soluzzjoni ta' 20 mg/ml LA tiġi dilwita b'fattur ta' 5 b'X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl ta' din is-soluzzjoni 4 mg/ml LA tiġi trasferita fi bwejra ta' blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Din is-soluzzjoni tiġi dilwita b'fattur ta' 2 b'X-VIVO™ 15 u mbagħad terġa' tiġi dilwita b'fattur ta' 2 biex tipproduċi soluzzjonijiet ta' 2 mg/ml u ta' 1 mg/ml. 50 µl ta' dawn it-tliet soluzzjonijiet u l-kontroll b'veikolu (X-VIVO™ 15) jiżdiedu ma' 50 µl ta' sospensjoni taċ-ċelloli THP-G8 fil-bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. Kull konċentrazzjoni tal-kontroll negattiv tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Il-pjastra titheżżeż fuq xejker tal-pjastri, u tiġi inkubata f'inkubatur tas-CO_2 għal 16-il siegħa (37°C, 5 % CO_2), u wara dan l-attività tal-luċiferaži titkejjel kif deskritt fil-paragrafu 29.

24. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi jew negattivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli.

25. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn bwejriet minn sustanzi kimiċi tat-test, eż. billi l-pjastra tiġi ssiġillata qabel l-inkubazzjoni bis-sustanzi kimiċi tat-test.

26. Is-sustanzi kimiċi tat-test u l-kontroll b'solvent jeħtieġu minn tnejn sa erba' sessjonijiet biex jinkiseb tbassir pożittiv jew negattiv (ara t-Tabella 2). Kull sessjoni ssir f'ġurnata differenti b'soluzzjoni ewlenija ġdida ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanzi kimiċi tat-test u ta' ċelloli miġbura indipendentement. Iċ-ċelloli jistgħu jkunu ġejjin mill-istess passaġġ.

▼M8

Kejlijiet tal-attività tal-luċiferaża

27. Il-luminexxenza titkejjel bl-użu ta' luminometru tal-mikropjastri b'96 bwejra mgħammra b'filtri ottiċi, eż. Phelios (ATTO, Tokyo, il-Ġappun), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, il-Ġermanja) u s-serje ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, l-Istati Uniti). Il-luminometru jrid jiġi kalibrat għal kull test biex tiġi żgurata riproduċibbiltà (19). Il-luċiferażijiet rikombinanti li jemettu l-oranġjo u l-aħmar huma disponibbli għal dan il-kalibrar.

28. 100µl tar-reaġent tal-assaġġ tal-Luċiferaża msaħħan bil-lest Tripluc® (Tripluc) jiġi trasferit f'kull bwejra tal-pjastra li jkun fiha s-sospensjoni taċ-ċelloli trattata b'sustanza kimika jew mingħajr. Il-pjastra titħeżżeż għal 10 min f'temperatura ambejntali ta' madwar 20°C. Il-pjastra titqiegħed fil-luminometru biex titkejjel l-attività tal-luċiferaża. Il-bijoluminexxenza titkejjel għal 3 sek kull waħda fin-nuqqas (F0) u fil-preżenza (F1) tal-filtru ottiku. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni għall-użu ta' ssettjar alternattiv, eż. skont il-mudell tal-luminometru użat.

29. Il-parametri għal kull konċentrazzjoni jiġu kkalkolati mill-valuri mkejla, eż. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, ±SD medja tal-IL8LA, ±SD medja tal-GAPLA, ±SD medja tal-nIL8LA, ±SD medja tal-Ind-IL8LA, ±SD medja tal-Inh-GAPLA, u l-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA. Id-definizzjonijiet tal-parametri użati f'dan il-paragrafu huma pprovduti fl-Appendiċijiet 3.1 u 3.4.

30. Qabel il-kejl, id-diskriminazzjoni tal-kulur f'assaġġi indikatur b'diversi kuluri ġeneralment tinkiseb bl-użu ta' detetturi (luminometru u apparati għall-qari tal-pjastri) mgħammra b'filtri ottiċi, bħal filtri sharp-cut (long-pass jew short-pass) jew filtri band-pass. Il-koeffiċjenti ta' trażmissjoni tal-filtri għal kull kulur tas-sinjali tal-bijoluminexxenza għandhom jiġu kalibrati qabel kull test, skont l-Appendiċi 3.2.

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-*Data*

31. Il-kriterji għal deċiżjoni pożittiva/negattiva jeħtieġu li f'kull sessjoni:

— tbassir tal-assaġġ IL-8 Luc jiġi ġġudikat pożittiv jekk sustanza kimika tat-test ikollha Ind-IL8LA ≥ 1,4 u l-limitu inferjuri tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA ≥ 1,0

— tbassir tal-assaġġ IL-8 Luc jiġi ġġudikat negativ jekk sustanza kimika tat-test ikollha Ind-IL8LA < 1,4 u/jew il-limitu inferjuri tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA < 1,0

Mudell ta' tbassir

32. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jipprovdu żewġ riżultati pożittivi minn fost l-1el, it-2ni, it-3et jew ir-4a sessjoni jiġu identifikati bħala pożittivi filwaqt li dawk li jagħtu tliet riżultati negattivi minn fost l-1el, it-2ni, it-3et jew ir-4a sessjoni jiġu identifikati bħala supponuti negattivi (Tabella 2). Fost is-sustanzi kimiċi supponuti negattivi, is-sustanzi kimiċi li jiġu dissolti f'20 mg/ml ta' X-VIVO™ 15 huma ġġudikati bħala negattivi, filwaqt li s-sustanzi kimiċi li ma jiġux dissolti f'20 mg/ml ta' X-VIVO™ 15 ma għandhomx jiġu kkunsidrati (Figura 1).

▼M8

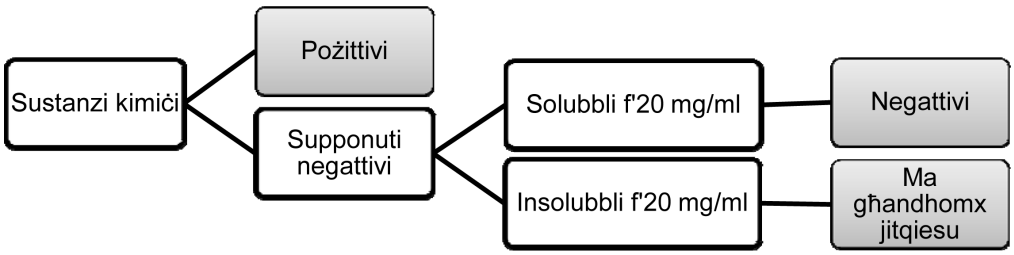
Tabella 2

Kriterji għall-identifikazzjoni tal-pożittivi u tas-supponuti negattivi

L-1el sessjoni	It-2ni sessjoni	It-3et sessjoni	Ir-4a sessjoni	Tbassir finali
Pożittiv	Pożittiv	–	–	Pożittiv
	Negattiv	Pożittiv	–	Pożittiv
		Negattiv	Pożittiv	Pożittiv
			Negattiv	Supponut Negattiv
Negattiv	Pożittiv	Pożittiv	–	Pożittiv
		Negattiv	Pożittiv	Pożittiv
			Negattiv	Supponut Negattiv
	Negattiv	Pożittiv	Pożittiv	Pożittiv
			Negattiv	Supponut Negattiv
		Negattiv	–	Supponut Negattiv

Figura 1

Mudell ta' tbassir għall-ġudizzju finali



Kriterji ta' aċċettazzjoni

33. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża l-assaġġ IL-8 Luc:

— Ind-IL8LA għandha tkun aktar minn 5,0 f'tal-anqas konċentrazzjoni waħda tal-kontroll pożittiv, 4-NBB, f'kull sessjoni.

— Ind-IL8LA għandha tkun anqas minn 1,4 fi kwalunkwe konċentrazzjoni tal-kontroll negattiv, aċidu lattiku, f'kull sessjoni.

— Id-*data* mill-pjastri li għalihom il-GAPLA tal-bwejriet tal-kontroll b'ċelloli u bi Tripluc iżda mingħajr sustanzi kimiċi tkun anqas minn 5 darbiet dik ta' bwejra li jkun fiha l-medium tat-test biss (50 µl/bwejra RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS u 50 µl/bwejra X-VIVO™ 15) għandha tiġi rifjutata.

— Id-*data* mill-pjastri li għalihom l-Inh-GAPLA tal-konċentrazzjonijiet kollha tas-sustanzi kimiċi tat-test jew tal-kontroll tkun anqas minn 0,05 għandha tiġi rifjutata. F'dan il-każ, l-ewwel test għandu jiġi ripetut biex l-ogħla konċentrazzjoni finali tat-test ripetutt tkun l-anqas konċentrazzjoni finali tat-test preċedenti.

▼M8

Rapport tat-test

34. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi kimiċi tat-test

Sustanza monokostitwenti:

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Is-solubbiltà f'X-VIVO™ 15. Għal sustanzi kimiċi li huma insolubbli f'X-VIVO™ 15, jekk jiġux osservati preċipitazzjoni jew flotazzjoni wara ċ-ċentrifugazzjoni;

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test jekk ma jintużax X-VIVO™ 15.

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita:

— Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Is-solubbiltà f'X-VIVO™ 15. Għal sustanzi kimiċi li huma insolubbli f'X-VIVO™ 15, jekk jiġux osservati preċipitazzjoni jew flotazzjoni wara ċ-ċentrifugazzjoni;

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test jekk ma jintużax X-VIVO™ 15.

Kontrolli

Kontroll pożittiv:

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;

▼**M8**

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, tħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv:

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem/ismijiet IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintużaw kontrolli negattivi oħra li ma jkunux fost dawk imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;

Il-kundizzjonijiet tat-test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tat-test użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-faċilità mnejn inkisbet);

— In-numru tal-lott u l-oriġini tal-FBS, isem il-fornitur, in-numru tal-lott tal-pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra, u n-numru tal-lott tar-reaġent Tripluc;

— In-numru ta' passaġġi u d-densità taċ-ċelloli użati għall-ittestjar;

— Il-metodu ta' għadd taċ-ċelloli għat-tiżrigħ qabel l-ittestjar u l-miżuri meħudin biex tiġi żgurata distribuzzjoni omoġena tan-numru ta' ċelloli;

— Il-luminometru użat (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrument, is-substrat ta' luċiferaži użat, u wiri tal-kejlijiet ta' luminexxenza xierqa fuq il-bażi tat-test tal-kontroll deskritt fl-Appendiċi 3.2;

— Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju biex iwettaq it-test (eż. billi jiġu ttestjati s-sustanzi ta' profiċjenza) jew biex tintwera prestazzjoni riproduċibbli tat-test matul iż-żmien.

Il-proċedura tat-test

— In-numru ta' repliki u ta' sessjonijiet imwettqa;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, il-proċedura ta' applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment (jekk ikunu differenti minn dawk rakkomandati);

▼**M8**

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

— Il-kejlijiet tal-IL8LA u tal-GAPLA;

— Il-kalkoli għall-nIL8LA, għall-Ind-IL8LA, u għall-Inh-GAPLA;

— L-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA;

— Graff li turi l-kurvi ta' doża-rispons għall-induzzjoni tal-attività tal-luċiferaži u għall-vijabbiltà;

— Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-riżultati

— Diskussjoni tar-riżultati miksuba bl-assaġġ IL-8 Luc;

— Kunsiderazzjoni tar-riżultati tal-assaġġ fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, u Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, u Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, u Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, u Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, u Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). *Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists,* OECD Publishing, Pariġi. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, u Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, u Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, u Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Pariġi, Franza

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Pariġi, Franza.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Disponibbli fuq. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, u Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Pariġi, Franza.

(21) In-Nazzjonijiet Uniti (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼M8

Appendiċi 3.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' konkordanza biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (16).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): Sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (22).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

CV05: Il-vijabbiltà taċ-ċelloli 05, jiġifieri l-konċentrazzjoni minima li fiha s-sustanzi kimiċi juru anqas minn 0,05 tal-Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-Ind-IL8LA. Ara Ind-IL8LA għad-definizzjoni.

GAPLA: Attività tal-Luċiferaża tal-Luċiferaża Ħamra Stabbli (SLR) (λmass = 630 nm), regolata mill-promotur tal-GAPDH u turi l-vijabbiltà taċ-ċelloli u n-numru ta' ċelloli vijabbli.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), il-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-ħtieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

II-SLR-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-Inh-GAPLA. Ara Inh-GAPLA għad-definizzjoni.

IL-8 (Interlewkina-8): Ċitokina derivata minn ċelloli endoteljali, minn fibroblasti, minn keratinoċiti, minn makrofagi, u minn monoċiti li tikkawża kemotassi tan-newtrofili u tal-linfoċiti taċ-ċelloli-T.

IL8LA: Attività tal-Luċiferaża tal-Luċiferaża Oranġjo Stabbli (SLO) (λmass = 580 nm), regolata mill-promotur tal-IL-8.

Ind-IL8LA: Induzzjoni ta' drabi tal-nIL8LA. Tinkiseb bid-diviżjoni tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi b'dik ta' ċelloli THP-G8 mhux stimolati u tirrappreżenta l-induzzjoni tal-attività tal-promotur tal-IL-8 mis-sustanzi kimiċi.

Inh-GAPLA: Inibizzjoni tal-GAPLA. Tinkiseb bid-diviżjoni tal-GAPLA tat-THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi b'GAPLA ta' THP-G8 mhux trattati u tirrappreżenta ċ-ċitotossiċità tas-sustanzi kimiċi.

Limitu minimu ta' induzzjoni (MIT): l-anqas konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tissodisfa l-kriterji pożittivi

▼M8

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn wieħed mill-kostitwenti ewlenin ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

nIL8LA: L-attività tal-luċiferaża SLO li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8 (IL8LA) normalizzata bl-attività tal-luċiferaża SLR li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH (GAPLA). Din tirrappreżenta l-attività promotur tal-IL-8 wara li tikkunsidra l-vijabbiltà taċ-ċelloli jew in-numru ta' ċelloli.

nSLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-nIL8LA. Ara nIL8LA għad-definizzjoni.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Preapteni: Sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika.

Proapteni: Sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jeħilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (16).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorarji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (16).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (16).

SLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-IL8LA. Ara IL8LA għad-definizzjoni.

SLR-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-GAPLA. Ara GAPLA għad-definizzjoni.

▼M8

Kontroll b'solvent/veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test ħlief tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bażi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbliment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (16).

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksuba bi kwalunkwe proċess ta' manifattura tal-produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabbiltà tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, iżda eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabbiltà tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha.

Tensjoattiv: Imsejjaħ ukoll aġent tensjoattiv, dan huwa sustanza, bħal deterġent, li tista' tnaqqas it-tensjoni tas-superfiċje ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtella' r-raġwa jew jippenetra solidi; hu magħruf ukoll bħala aġent li jxarrab. (TG437)

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu.

THP-G8: Linja ta' ċelloli indikatur IL-8 użata fl-assaġġ IL-8 Luc. Il-linja ta' ċelloli umana qisha makrofagu, THP-1, ġiet transfettata fil-ġeni tal-luċiferaži SLO u SLR taħt il-kontroll tal-promoturi tal-IL-8 u tal-GAPDH, rispettivament.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (21).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Metodu ta' ttestjar validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit.

▼**M8**

Appendiċi 3.2

IL-PRINĊIPJU TAL-KEJL TAL-ATTIVITÀ TAL-LUĊIFERAŻI U D-DETERMINAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENTI TA' TRAŻMISSJONI TAL-FILTRU OTTIKU GĦALL-SLO U GĦALL-SLR

Sistema ta' Assaġġ b'Diversi Indikaturi -Tripluc- tista' tintuża b'luminometru tat-tip tal-mikropjastri b'sistema ta' detezzjoni b'diversi kuluri, li jista' jitqabbdilha filtru ottiku (eż. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Il-filtru ottiku użat fil-kejl hu filtru long jew short pass ta' 600–620 nm, jew filtru band pass ta' 600–700 nm.

Il-kejl ta' luċiferażijiet b'żewġ kuluri b'filtru ottiku.

Dan hu eżempju bl-użu ta' Phelios AB-2350 (ATTO). Dan il-luminometru hu mgħammar b'filtru long pass ta' 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, Filtru 1) għall-qsim tal-luminexxenza tal-SLO (λmass = 580 nm) u tal-SLR (λmass = 630 nm).

Biex jiġu determinati l-koeffiċjenti ta' tarżmissjoni tal-LP ta' 600 nm, l-ewwel, bl-użu tal-enzimi tal-luċiferaži SLO u SLR purifikati, kejjel i) l-intensità tal-bijoluminexxenza tal-SLO u tal-SLR mingħajr filtru (F0), ii) l-intensità tal-bijoluminexxenza tal-SLO u tal-SLR li tgħaddi minn LP ta' 600 nm (Filgru 1), u iii) ikkalkola l-koeffiċjenti ta' trażmissjoni tal-LP ta' 600 nm għall-SLO u għall-SLR elenkati hawn taħt.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Meta l-intensità tal-SLO u tal-SLR fil-kampjun tat-test jiġu definiti bħala O u R, rispettivament, i) l-intensità tad-dawl mingħajr filtru (kollox ottiku) F0 u ii) l-intensità tad-dawl li jittrażmetti mil-LP ta' 600 nm (Filtru 1) F1 jiġu deskritti kif muri hawn taħt.

F0 = O+R

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Dawn il-formuli jistgħu jiġu spjegat kif ġej:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Imbagħad bl-użu tal-fatturi ta' trażmittenza kkalkolati (κO_{R60} u κR_{R60}) u l-F0 u l-F1 imkejla, tkun tista' tikkalkola l-valur O u R kif ġej:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

Il-materjali u l-metodi għad-determinazzjoni tal-fattur ta' trażmittanza

(1) Reaġenti

Enzimi tal-luċiferaži purifikati individwali:

Enzima tal-SLO purifikata lijofilizzata

Enzima tal-SLR purifikata lijofilizzata

(li għax-xogħol ta' validazzjoni nkisbu mill-GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, il-Ġappun mal-linja ta' ċelloli THP-G8)

Reaġent tal-assaġġ:

Reaġent tal-assaġġ tal-Luċiferaži Tripluc® (pereżempju minn TOYOBO Cat#MRA-301)

Medium: għall-assaġġ tal-luċiferaži (30 ml, maħżuna f'2 – 8°C)

Reaġent	Konċ.	Konċ. finali fil-medium	Ammont meħtieġ
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Tħejjija tas-soluzzjoni tal-enzimi

Iddisolvi l-enzima tal-luċiferaži purifikata lijofilizzata f'tubu billi żżid 200 µl ta' 10 ~ 100 mM Tris/HCl jew Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) supplimentat b'10 % (w/v) gliċerol, iddividi s-soluzzjoni tal-enzima f'alikwoti ta' 10 µl f'tubi li jintremew ta' 1,5 ml u aħżinhom fi friżer f'-80°C. Is-soluzzjoni tal-enzima ffriżata tista' tintuża sa sitt xhur wara. Meta tintuża, żid 1 ml medium għall-assaġġ tal-luċiferaži (RPMI-1640 b'10 % FBS) f'kull tubu li jkun fih is-soluzzjonijiet tal-enzimi (soluzzjoni tal-enzimi dilwita) u żommhom fuq is-silġ biex tipprevjeni d-diżattivazzjoni.

(3) Kejl tal-bijoluminexxenza

Ħoll ir-reaġent tal-assaġġ tal-Luċiferaži Tripluc® (Tripluc) u żommu f'temperatura ambejntali f'banjumarija jew f'temperatura tal-arja ambjentali. Ixgħel il-luminometru 30 min qabel ma tibda l-kejl biex tħalli l-fotomoltiplikatur jistabbilizza. Ittrasferixxi 100 µl tas-soluzzjoni tal-enzima dilwita fi pjastra sewda b'96 bwejra (qiegħ ċatt) (il-kampjun ta' riferiment tal-SLO għal #B1, #B2, #B3, il-kampjun ta' riferiment tal-SLR għal #D1, #D2, #D3). Imbagħad ittrasferixxi 100 µl ta' Tripluc imsaħħan minn qabel f'kull bwejra tal-pjastra li jkun fiha s-soluzzjoni tal-enzima dilwita bl-użu ta' pipetman. Ħawwad il-pjastra għal 10 min f'temperatura ambjentali (madwar 25°C) billi tuża xejker tal-pjastri. Neħħi l-bżieżaq mis-soluzzjonijiet fil-bwejriet jekk jitilgħu. Qiegħed il-pjastra fil-luminumetru biex tkejjel l-attività tal-luċiferaži. Il-bijoluminexxenza titkejjel għal 3 sek kull waħda fin-nuqqas (F0) u fil-preżenza (F1) tal-filtru ottiku.

Il-koeffiċjent ta' trażmissjoni tal-filtru ottiku ġie kkalkolat kif ġej:

Koeffiċjent ta' trażmissjoni (SLO (κO_{R60}))= (#B1 tal-F1+ #B2 tal-F1+ #B3 tal-F1) / (#B1 tal-F0+ #B2 tal-F0+ #B3 tal-F0)

▼**M8**

Koeffiċjent ta' trażmissjoni (SLR (κR_{R60}))= (#D1 tal-F1+ #D2 tal-F1+ #D3 tal-F1) / (#D1 tal-F0+ #D2 tal-F0+ #D3 tal-F0)

Il-fatturi kkalkolati tat-trażmittenza jintużaw għall-kejlijiet kollha eżegwiti bl-użu tal-istess luminometru.

Kontroll tal-kwalità tat-tagħmir

Għandhom jintużaw il-proċeduri deskritti fil-protokoll IL-8 Luc (18).

▼**M8**

Appendiċi 3.3

SUSTANZI TA' PROFIĊJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu t-tbassir mistenni tal-assaġġ IL-8 Luc għad-disa' sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas tmienja mid-disa' sustanzi ta' profiċjenza (magħżula biex jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi għall-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda). Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bl-assaġġ IL-8 Luc. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għall-assaġġ IL-8 Luc (6) (1).

Tabella 1

Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bl-assaġġ IL-8 Luc

Sustanzi ta' profiċjenza	Numru tas-CAS	Stat	Solubbiltà f X-VIVO15 f'20 mg/ml	Tbassir *in vivo* (1)	Tbassir tal-IL-8 Luc (2)	Medda ta' riferiment (μg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-Dinitroklorobenżen	97-00-7	Solidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Estrem)	Pożittiv	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldeid	50-00-0	Likwidu	Solubbli	Sensitizzatur (B'saħħtu)	Pożittiv	9-30	4-9
2-Merkaptobenżotjażol	149-30-4	Solidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Moderat)	Pożittiv	250-290	60-250
Etilendiammina	107-15-3	Likwidu	Solubbli	Sensitizzatur (Moderat)	Pożittiv	500-700	0,1-0,4
Dimetakilat tal-Etileneglikol	97-90-5	Likwidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Dgħajjef)	Pożittiv	>2000	0,04-0,1
4-Allilanisol (Estragol)	140-67-0	Likwidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Dgħajjef)	Pożittiv	>2000	0,01-0,07
Sulfat tal-istreptomiċina	3810-74-0	Solidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000
Isopropanol	67-63-0	Likwidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000

Abbrevjazzjonijiet: Nru tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi
(1) Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (19).
(2) Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (1) (6).
(3) CV_{05} u IL-8 Luc MIT ġew ikkalkolati bl-uż tas-solubbiltà fl-ilma mogħtija minn EPI Suite™.
(4) CV_{05}: il-konċentrazzjoni minima li fiha s-sustanzi kimiċi juru anqas minn 0,05 tal-Inh-GAPLA.
(5) MIT: l-anqas konċentrazzjonijiet li fihom sustanza kimika tissodisfa l-kriterji pożittivi.

▼M8

Appendiċi 3.4

INDIĊIJIET U KRITERJI TA' ĠUDIZZJU

nIL8LA (nSLO-LA)

Ir-ripetizzjoni nru j (j = 1-4) tal-konċentrazzjoni nru i (i = 0-11) titkejjel għall-IL8LA (SLO-LA) u għall-GAPLA (SLR-LA) rispettivament. L-IL8LA normalizzata, imsejħa nIL8LA (nSLO-LA), u hi definita bħala:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Din hi l-unità bażika tal-kejl f'dan l-assaġġ.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Iż-żieda ta' drabi tal-nIL8LA medja (nSLO-LA) għar-ripetizzjoni tal-konċentrazzjoni nru i mqabbla magħha fil-konċentrazzjoni 0, Ind-IL8LA, hi l-kejl primarju ta' dan l-assaġġ. Dan il-proporzjon hu miktub bil-formula li ġejja:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Il-laboratorju prinċipali ppropona li valur ta' 1,4 jikkorrispondi għal riżultat pożittiv għas-sustanza kimika ttestjata. Dan il-valur hu bbażat fuq l-investigazzjoni tad-*data* storika tal-laboratorju prinċipali. It-tim ta' ġestjoni tad-*data* mbagħad uża dan il-valur fil-fażijiet kollha tal-istudju ta' validazzjoni. L-eżitu primarju, Ind-IL8LA, hu l-proporzjon ta' żewġ medji aritmetiċi kif murija fl-ekwazzjoni.

Intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (CI ta' 95 %)

L-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (CI ta' 95 %) fuq il-bażi tal-proporzjon jista' jiġi stmat li juri l-preċiżjoni ta' dan il-kejl tal-eżitu primarju. Il-limitu inferjuri tas-CI ta' 95 % ≥ 1 jindika li l-nIL8LA bil-konċentrazzjoni nru i hi ferm akbar minn dik bil-kontroll b'solvent. Hemm diversi modi biex jinbena s-CI ta' 95 %. Aħna użajna l-metodu magħruf bħala t-teorema ta' Fieller f'dan l-istudju. Din it-teorima tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tinkiseb mill-formula li ġejja:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

Fejn

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \textstyle\sum_j \mathrm{nIL8LA_{0j}}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$

hi l-perċentil ta' 97,5 tad-distribuzzjoni ċentrali t bil-ν tal-grad ta' libertà, fejn

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

L-Inh-GAPLA hi l-proporzjon tal-GAPLA medja (SLR-LA) għar-ripetizzjoni tal-konċentrazzjoni nru i meta mqabbla ma' dik bil-kontroll b'solvent, u din tinkiteb permezz ta'

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

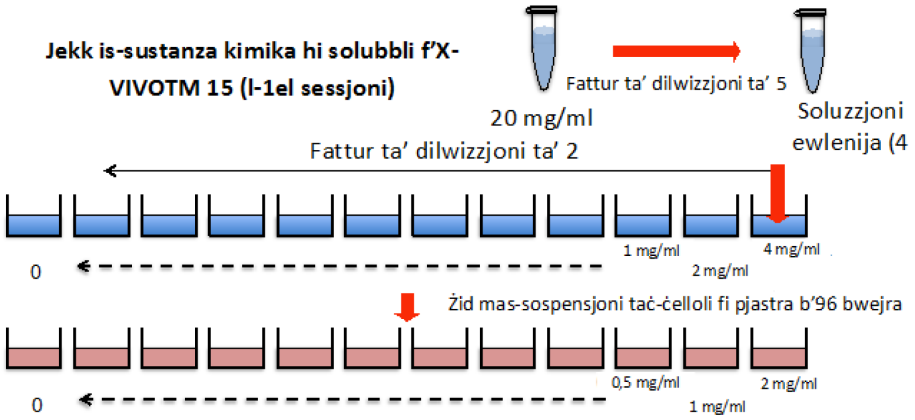
Peress li l-GAPLA hi d-denominatur tal-nIL8LA, valur estremament żgħir jikkawża varjazzjoni kbira fl-nIL8LA. Għaldaqstant, valuri tal-Ind-IL8LA b'valur estremament żgħir tal-Inh-GAPLA (anqas minn 0,05) jistgħu jitqiesu li għandhom preċiżjoni baxxa.

▼**M8**

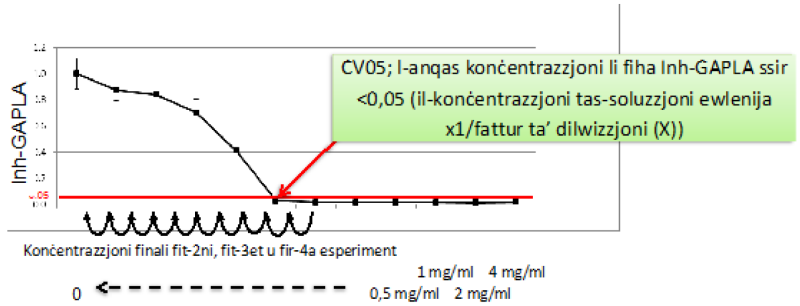
Appendiċi 3.5

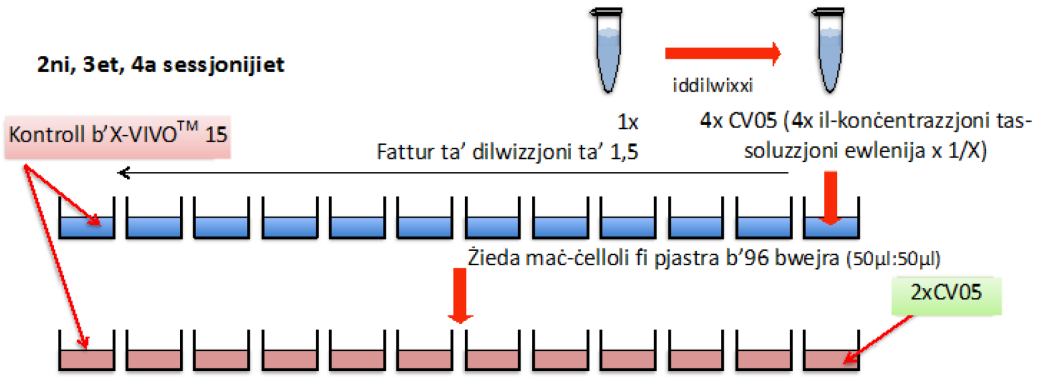
L-ISKEMA TAL-METODI BIEX JIĠU DISSOLTI SUSTANZI KIMIĊI GĦALL-ASSAĠĠ IL-8 LUC.

(a) Għal sustanzi kimiċi dissolti f'X-VIVO^{TM} 15 f'20 mg/ml



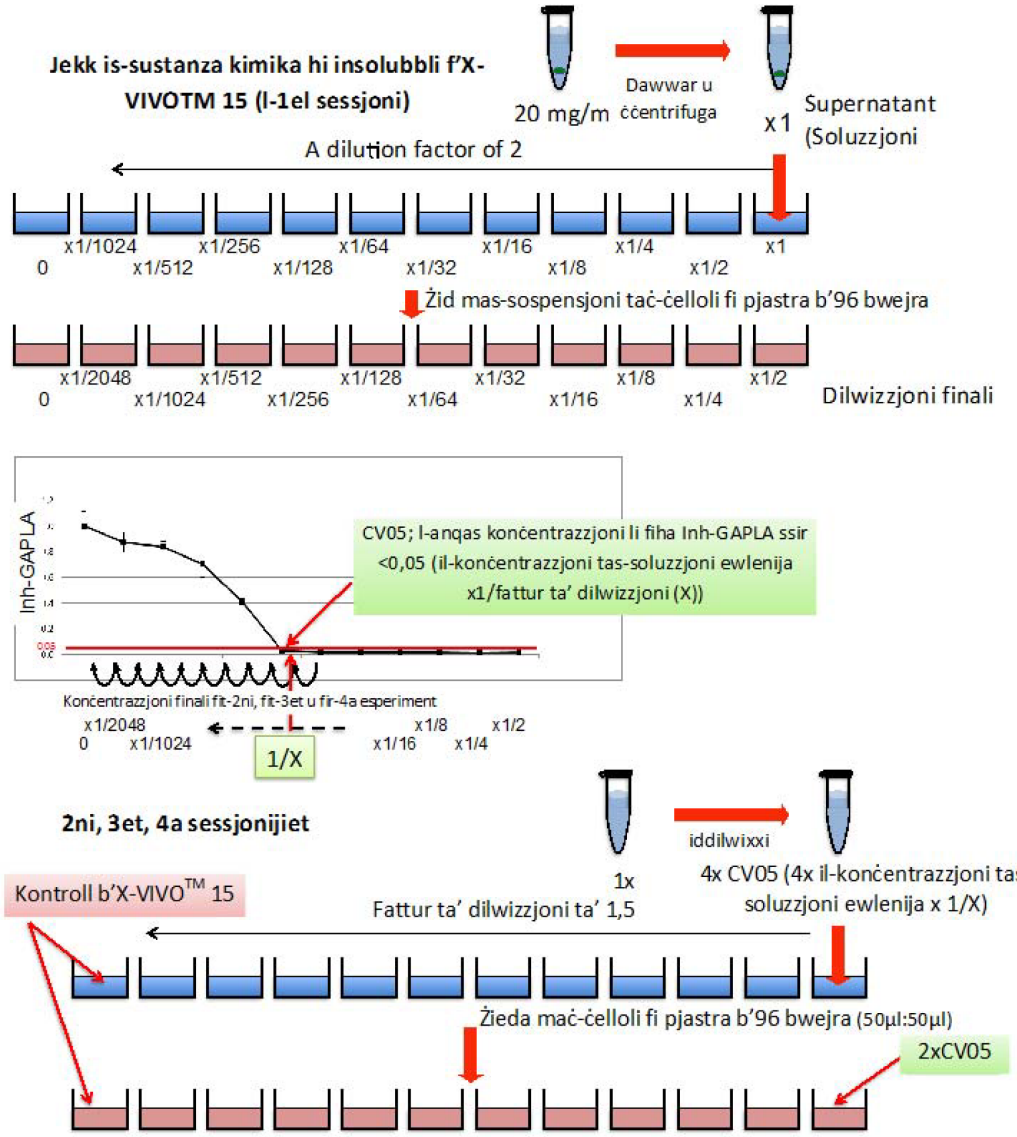
Iddetermina l-ogħla konċentrazzjoni tal-esperimenti li ġejjin





▼**M8**

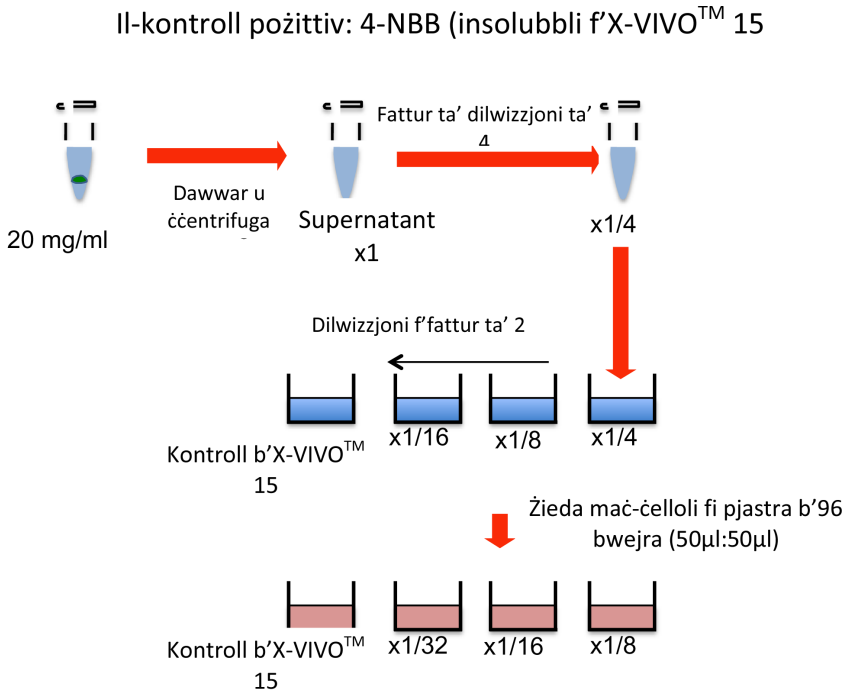
(b) Għal sustanzi kimiċi insolubbli f'X-VIVO^{TM} 15 f'20 mg/ml



▼**M8**

Appendiċi 3.6

L-ISKEMA TAL-METODU BIEX JIĠI DISSOLT 4-NBB GĦALL-KONTROLL POŻITTIV TAL-ASSAĠĠ IL-8 LUC.



"

▼B

PARTI Ċ: IL-METODI GĦAD-DETERMINAZZJONI TA' L-EKOTOSSIĊITÀ

WERREJ

C.1.	TOSSIĊITÀ AKUTA GĦALL ĦUT
C.2.	IT-TEST TA' L-IMMOBBILIZZAZZJONI AKUTA *DAPHNIA SP.*
C.3.	ALGA TAL-ILMA ĦELU U ĊJANOBATTERJI, TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR
C.4.	DETERMINAZZJONI TAL-BIJODEGRADABBILITÀ LESTA
PARTI I.	KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI
PARTI II.	DOC TEST TAT-TNEĦĦIJA TAL-KULUR (Metodu C.4-A)
PARTI III.	TEST TA' L-GĦAŻLA OECD MODIFIKATA (Metodu °C.4-B)
PARTI IV.	TEST TA' L-EVOLUZZJONI CO_2 (Metodu °C.4-C)
PARTI V.	TEST TAR-RESPIROMETRIJA MANJOMETRIKA (Metodu C.4-D)
PARTI VI.	TEST TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ (Metodu °C.4-E)
PARTI VII.	TEST M.I.T.I. (Metodu °C.4-F)
C.5.	DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU BIOKEMIKALI
C.6.	DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU KEMIKALI
C.7.	ID-DEGRADAZZJONI – ID-DEGRADAZZJONI ANTIBIJOTIKA: L-IDROLISI BĦALA FUNZJONI TAL-PH
C.8.	IT-TOSSIĊITÀ TAL-ĦNIEX
C.9.	ID-DEGREDAZZJONI BIJOLOĠIKA
C.10.	TRATTAMENT TA' SIMULAZZJONI TESTAEROBIKA TAD-DRANAĠĠ: C.10-A: UNITAJIET TA' ĦAMA ATTIVAT - C.10-B: BIJORITI
C.11.	ĦAMA ATTIVATA, TEST TAL-INIBIZZJONI RESPIRATORJA (KARBONJU U OSSIDAZZJONI TAL-AMMONIJAKA)
C.12.	BIODEGRADAZZJONI
C.13.	BIJOAKKUMULAZZJONI FIL-ĦUT: ESPONIMENT MILWIEM U DJETETIKU
Ċ.14.	PROVA TA' L-IŻVILUPP FIŻ-ŻGĦOŻIJA TAL-ĦUT
C.15.	PROVA TA' TOSSIĊITÀ B'TERMINU QASIR FUQ *EMBRIJONI* U STADJI TA' SAC- FRY TAL-ĦUT
C.16.	NAĦAL – PROVA TA' TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA
C.17.	NAĦAL – PROVA TA' TOSSIĊITÀ AKUTA MILL-KUNTATT
C.18.	ADSORBIMENT/DESORBIMENT BL-UŻU TAL-METODU TA' L-EKWILIBRIJU TA' GRUPPI

▼B

C.19.	ESTIMAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENT TA' ADSORPTION (K_{OC}) FUQ IL-ĦAMRIJA U FUQ ĦAMA TAD-DRENAĠĠ BL-UŻU TA' KROMATOGRAFIJA TA' LIKWIDU LI JIPPER-FORMA GĦOLI (HPLC)
C.20.	TEST TAR-RIPRODUZZJONI DAPHNIA MAGNA
C.21.	MIKROORGANIŻMI TAL-ĦAMRIJA: TEST TAT-TRASFOR-MAZZJONI TAN- NITROĠENU
C.22.	MIKROORGANIŻMI TAL-ĦAMRIJA: TEST TAT-TRASFOR-MAZZJONI TAL- KARBONJU
C.23.	TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIL-ĦAM-RIJA
C.24.	TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIS-SEDI-MENT TAS-SISTEMI AKWATIĊI
C.25.	MINERALIZZAZZJONI LI TEĦTIEĠ L-OSSIĠNU FL-ILMA TAL-WIĊĊ — TEST TAS-SIMULAZZJONI TAL-BIJODEGRA-DAZZJONI
C.26.	TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR TAL-ISPEĊI LEMNA
C.27.	TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMEN-T-ILMA BL-UŻU TA' SEDIMENT IMĦALLAT
C.28.	TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMEN-T-ILMA BL-UŻU TA' ILMA FORTIFIKAT
C.29.	BIJODEGRADABBILTÀ FAĊLI - CO_2 F'REĊIPJENTI SSIĠIL-LATI (TEST TA' SPAZJU FUQ)
C.30.	AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' OLIGOCHAETES TERRESTRI
C.31.	TEST TAL-PJANTA TERRESTRI: TFAĊĊJAR TAN-NEBBIET U TEST TAT-TKABBIR TAN-NEBBIET
C.32.	TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ENCHYTRAEID
C.33.	TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ĦNIEX (*EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI*)
C.34.	DETERMINAZZJONI TAL-INIBIZZJONI TAL-ATTIVITÀ TAL-BATTERJI ANAEROBIĊI — TNAQQIS FIL-PRODUZ-ZJONI TAL-GASS MINN ĦAMA (DRENAĠĠ) B'DIĠESTJONI ANAEROBIKANTI
C.35.	TEST TAT-TOSSIĊITÀ *LUMBRICULUS* TAN-NAQAL/ILMA PERMEZZ TA' NAQAL MIŻJUD
C.36.	TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAD-DUD PREDATORJU (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) FIL-ĦAMRIJA
C.37.	ASSAĠĠ FUQ 21 JUM TAL-ĦUT: SKRINJAR FUQ PERJODU QASIR GĦAL ATTIVITÀ ESTROĠENIKA U ANDROĠE-NIKA, U INIBIZZJONI TAL-AROMATAŻI
C.38.	L-ASSAĠĠ TAL-METAMORFOSI TAL-AMFIBJI
C.39.	TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-KOLLEMBOLANI FIL-ĦAMRIJA

▼B

C.40.	TEST TAT-TOSSIĊITÀ TAĊ-ĊIKLU TAL-ĦAJJA TAL-KIRONOMIDI F'ILMA TAN-NAQAL BL-UŻU TA' ILMA MIŻJUD JEW NAQAL MIŻJUD
C.41.	TEST TAL-IŻVILUPP SESSWALI TAL-ĦUT
C.42.	BIJODEGRADABILITÀ FL-ILMA BAĦAR
C.43.	IL-BIJODEGRADABILITÀ ANEJROBIKA TAS-SUSTANZI ORGANIĊI FIL-ĦAMA DIĠESTITA: BIL-KEJL TAL-PRODUZZJONI TAL-GASS
C.44.	LISSIJA F'KOLONNI TAL-ĦAMRIJA
C.45.	STIMA TAL-EMISSJONIJIET MILL-INJAM ITTRATTAT BIL-PRESERVATTIV FL-AMBJENT: IL-METODU TAL-LABORATORJU GĦALL-KOMODITAJIET TAL-INJAM LI MHUMIEX KOPERTI U LI HUMA F'KUNTATT MA' ILMA ĦELU JEW ILMA BAĦAR
C.46.	BIJOAKKUMULAZZJONI F'OLIGOĊAETI BENTIĊI LI JGĦIXU FIN-NAQAL
C.47.	TEST TAT-TOSSIĊITÀ FI STADJU BIKRI TAL-ĦAJJA TAL-ĦUT
C.48.	ASSAĠĠ TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ĦUT FUQ ŻMIEN QASIR
C.49.	TEST TAT-TOSSIĊITÀ AKUTA TAL-EMBRIJUNI TAL-ĦUT (FET)
C.50.	MYRIOPHYLLUM SPICATUM ĦIELES MIS-SEDIMENT
C.51.	MYRIOPHYLLUM SPICATUM TAS-SEDIMENT TAL-ILMA
C.52.	TEST TAR-RIPRODUZZJONI TA' ĠENERAZZJONI ESTIŻA WAĦDA TA' MEDAKA (MEOGRT)
C.53.	L-ASSAĠĠ TAT-TKABBIR U TAL-IŻVILUPP TAL-ANFIBJI LARVALI (LADGA)

▼B

C.1. TOSSIĊITÀ AKUTA GĦALL ĦUT

1. METODU

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop ta' dan it-test huwa sabiex jiddetermina t-tossiċita letali akuta ta' sustanza għall-ħut fl-ilma ħelu. Huwa mixtieq li jkun hemm, sa kemm ikun possibbli, informazzjoni dwar is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, l-istabbilità kimika, ilpkostanti tad-disassoċjazzjoni u tal-biodegrabbilità tas-sustanza sabiex tgħin fil-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq (statiku, semi-statiku jew ta' kurrent kontinwu) sabiex ikunu assigurati l-konċentrazzjoninijiet kostanti sodisfaċenti tas-sustanza tat-test matul il-perijodu tat-test.

Informazzjoni addizzjonali (per eżempju l-formula strutturali, il-grad tal-purità, n-natura u l-persentaġġ ta' impuritajiet sinifikanti, l-preżenza u l-ammonti ta' addittivi, u l-koeffiċjent tal-qasma n-oktonal/ilma) għandhom ikunu meqjusa kemm fl-ippjanar tat-test u fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Tossiċità akuta hija l-effett ħażin apparenti intiż f'organiżmu matul perijodu qasir (jiem) ta' l-espożizzjoni tiegħu għal sustanza. Fit-test preżenti, tossiċità akuta hija espressa bħala l-konċentrazzjonini medjana letali (LC_{50}), jiġifieri l-konċentrazzjoni fl-ima li toqtol 50 % f'lott ta' prova ta' ġut matul perijodu kontinwu ta' l-espożizzjoni li għandu jkun mistqarr.

Il-konċentrazzjoninijiet kollha tas-sustanza fit-test huma mogħtija bil-piż/volum (milligrammi kull litru). Dawn jistgħu ikunu espressi wkoll bħala piż bil-piż ($mg.kg^{-1}$).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanza ta' referenza tista tkun ittestjata bħala mezz sabiex turi li l-kondizzjonijiet waqt it-test fil-laboratorju, ir-reazzjoni tal-ispeċi ittestjati ma jkunux inbidlu b'mod sinifikanti.

L-ebda sustanzi ta' referenza ma huma speċifikati f'din il-kitba.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Test limitat jista' jkun imwettaq fi 100 mg kull litru sabiex tkun determinata li il-LC_{50} tkun akbar minn din il-konċentrazzjoni.

Il-ħut hu espost għas-sustanza tat-test miżjuda ma' l-ilma fil-medda tal-konċentrazzjonijiet għal perijodu ta' 96 siegħa. Il-mortalitajiet huma irreġistrati fi mill-anqas intervalli ta' 24 siegħa, u l-konċentrazzjoninijiet li joqtlu 50 % tal-ħut (LC_{50}) f'kull żmien ta' l-osservazzjoni huma ikkalkolati, meta dan ikun possibbli

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Il-kriterja tal-kwalità għandha tkun applikabbli għal-limitu tat-test kif ukoll għall-metodu tat-test kollu.

Il-mortalità fil-kontrolli m'għandhiex teċċedi 10 % (jew ħuta waħda jekk anqas minn għaxa jkunu wżati) sat-tmiem tat-test.

Il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb għandha tkun ta' aktar monn 60 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja matul iż-żmien kollu.

▼B

Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test għandhom jinżammu sa fil-limitu ta' 80 % tal-konċentrazzjoninijiet inizjali matul iż-żmien kollu tat-test.

Għal sustanzi li jdubu faċilment fil-medja tat-test, b'hekk ifornu taħlitiet stabbli, i.e. dawk li ma jkollhomx reazzjoni volatili sinifikanti, jkollhom degradazzjoni, ikunu idrolizzati jew adsorbiti, l-konċentrazzjoni inizjali tista tkun meqjusa bħala ekwivalenti tal-konċentrazzjoni nominali. Evidenza għandha tkun ippreżentata li l-livelli tal-konċentrazzjonijiet ikunu nżammu matul it-test u li l-kriterja tal-kwalità kienet ġiet milħuqa.

Għal sustanzi li huma:

(i) ftit li xejn jinħallu fil-medja tat-test, jew

(ii) kapaċi li jiffurmaw emulsjonijiet jew dispersjonijiet stabbli, inkella

(iii) ma humiex stabbli f'taħlitiet akweji,

l-konċentrazzjonini inizjali għandha tkun meqjusa bħala l-konċentrazzjoni mkejla fit-taħlita (jew, jekk teknikament dan ma jkunx possibbli, imkejla f'kolonna ta' l-ilma) fil-bidu tat-test. Il-konċentrazzjoni għandha tkun determinata wara perijodu ta' ekwilibriju imma qabel l-introduzzjoni tal-ħut tat-test.

Fi kwalunkwe minn dawn il-każi, aktar kejl għandu jsir matul it-test sabiex jikkonferma l-konċentrazzjoni attwali ta' l-espożizzjoni jew li l-kriterja tal-kwalità tkun ġiet milħuqha.

Il-pH m'għandux ivarja b'aktar minn unità waħda.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Tlett tipi ta' proċedura jistgħu ikunu wżati:

Test statiku:

Test tat-tossiċità li fih l-ebda ċaqlieq ma jseħħ tat-taħlita tat-test. (It-taħlitiet jinqgħu mingħajr tibdil matul iż-żmien kollu tat-test.)

Test semi-statiku:

Test mingħajr ċaqlieq tat-taħlita tat-test, imma bit-tiġdid regolari tal-lottijiet tat-taħlitiet tat-test eara perijodi mtawwla (eż. 24 siegħa).

Test biċ-ċaqlieq kontinwu:

Test tat-tossiċità li fih l-ilma jkun imġedded regolarment fil-kabini tat-test, il-kimika li tkun ittestjata tiġi trasportata ma l-ilma użat għat-tiġdid tal-medja tat-test.

1.6.1. **Reaġenti**

1.6.1.1. *Taħlitiet tas-sustanzi tat-test*

Taħlitiet diġa lesti tas-saħħa meħtieġa huma preparati bit-tidwib tas-sustanza f'ilma de-jonizzat jew f'ilma skond 1.6.1.2.

Il-konċentrazzjoni tat-test kif magħżula huma ippreparati bit-tidwib tat-taħlita diġà lest. Jekk konċentrazzjoninijiet għoljin huma ttestjati, is-sustanza tista' tkun imdewba direttament mat-trattib ta' l-ilma.

▼B

Is-sustanza għandha normalment tkun ittestjata biss sal-limitu tas-solubbilità tagħha. Għal uħud mis-sustanzi (eż. sustanzi li jkollhom solubbilità baxxa fl-ilma, jew P_{ow9} għoli, jew dawk li jiffurmaw tixriq stabbli pjuttost milli taħlita vera fl-ilma), huwa aċċettabbli li tintuża l-konċentrazzjonini tat-test aktar għolja mil-limitu tal-solubbilità tas-sustanza sabiex ikun assigurat li s-solubbilità massima/stabbilità tal-konċentrazzjoni tkun intlaħqet. Huwa mportanti, b'danakollu, li din il-konċentrazzjoni ma tkunx b'mod ieħor tħawwad is-sistema tat-test (eż. li jkun hemm rita tas-sustanza fil-wiċċ ta' l-ilma li ma tħallix li jseħħ l-ossiġinazzjoni ta' l-ilma, eċċ.).

Tixrid ultrasoniku, solventi organiċi, emulsifikaturi jew dispersanti jistgħu jintużaw bħala għajnuna għat-tħejjija tat-taħlitiet bil-lest ta' sustanzi b'solubbilità baxxa fl-ilma jew sabiex jgħinu fit-tixrid ta' dawn is-sustanzi fil-medja tat-test. Meta tali sustanzi awżiljarji huma wżati, il-konċentrazzjoninijiet kollha tat-test għandhom jinkludu l-istess ammont tas-sustanza awżiljarja, u ħut addizzjonali tal-kontroll għandhom ikunu esposti għall-istess konċentrazzjoni tas-sustanza awżiljarja bħal dik użata fis-serje tat-test. Il-konċentrazzjoni ta' tali awżiljarji għandha tkun minimizzata, imma fl-ebda każ m'għandha teċċedi 100 mg kull litru fil-medja tat-test.

It-test għandu jkun imwettaq mingħajr l-aġġustament tal-pH. Jekk ikun hemm evidenza ta' tibdil qawwi fil-pH, huwa rakkomandat li t-test għandu jkun repetut bi pH aġġustat u r-riżultati inklużu fir-rapport. F'dak il-każ, il-valur tal-pH tat-taħlita bil-lest għandu jkun aġġustat għall-valur tal-pH ta' l-ilma tat-taħlit, sakemm ma jkunx hekk raġunijiet speċifiċi il-għala dan m'għandux isir. HCI u NaOH huma preferuti għal dan l-iskop. Dan l-aġġustament tal-pH għandu jsir b'tali mod hekk li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-taħlita bil-lest ma tkunx mibdula sa xi medda sinifikanti. Jekk ikun hemm xi reazzjoni kimika jew preċipitazzjoni fiżika tal-kompost tat-test ikkaġunata bl-aġġustament, dan għandu jkun mistqarr.

1.6.1.2. *Ilma taż-żamma u tat-trattib*

Forniment ta' ilma tax-xorb (mhux kontaminat b'konċentrazzjonijiet potenzalment ta' ħsara mill-klorin, metalli tqal jew sustanzi oħrajn), ilma naturali ta kwalità tajba jew ilma rikostitwita (ara l-Appendiċi I) jista jkun użat. Ilmijiet b'ebusija totali ta' bejn 10 u 250 mg kull litru (bħala $CaCO_3$) u bi pH minn 6,0 sa 8,5 huma preferuti.

1.6.2. **Apparat**

L-apparat kollu għandu jkun magħmul minn materjal kemikalment inert.

— sistema ta' taħlil awtomatiku (għal test b'ċaqlieq kontinwu),

— arloġġ ta' l-ossiġenu,

— apparat għad-determinazzjoni ta' l-ebusija ta' l-ilma,

— apparat adekwat għall-kontroll tat-temperatura,

— arloġġ pH.

1.6.3. **Hut tat-test**

Il-ħut għandu jkun f'kondizzjoni tajba tas-saħħa u ħieles minn xi malformazzjoni apparenti.

▼B

L-ispeċi użati għandhom ikunu magħżula fuq il-bażi ta' kriterja prattika, bħalma hija d-disponibbiltà faċli tagħhom matul is-sena, l-faċilità tal-manutenzjoni, l-konvenjenza għat-testijiet, is-sensittività relattiva għall-kimika u xi fatturi ekonomiċi, bioloġiċi u ekoloġiċi li jistgħu jaffettwaw ir-riżultati. Il-ħtieġa tal-kompattibbiltà tad-data akkwistat u l-armonizzazzjoni internazzjonali eżistenti (referenza 1) għandha wkoll tkun imfakkra meta ssir l-għażla tal-ispeċi tal-ħut.

Lista tal-ispeċi tal-ħut li huma rakkommandati għat-twettieq ta' dan it-test hija mogħtija fl-Appendiċi 2; il-ħut irrigat (taż-żebra) u t-trotta ikkulurita huma l-ispeċi preferuti.

1.6.3.1. *Iż-zamma*

Il-ħut tat-test preferibbilment jiġu minn lott wieħed ta' l-istess tul u età. Il-ħut għandu jinżamm għal mill-anqas 12-il jum, fil-kondizzjonijiet kif ġejjin:

tagħbija:

xierqa għas-sistema (riċirkolazzjoni jew kurrent kontinwu) u l-ispeċi tal-ħut,

l-ilma:

ara 1.6.1.2,

dawl:

12 sa 16-il siegħa ta' dawl kuljum,

konċentrazzjoni ta' ossiġenu mdewweb:

mill-anqas 80 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja,

ikel:

tlett darbiet fil-ġimgħa jew kull jum, jieqaf 24 siegħa qabel il-bidu tat-test.

1.6.3.2. *Mortalità*

B'segwiment tal-perijodu ta' 48 siegħa sakem joqgħodu, il-mortalitajiet huma reġistrati u din il-kriterja li ġejja għandha tkun applikata:

— aktar minn 10 % tal-popolazzjoni matul sebat ijiem:

ċaħda tal-lott kollu kemm hu,

— bejn 5 u 15 % tal-popolazzjoni:

perijodu taż-żamma ikompli għal sebat ijiem addizzjonali.

Jekk l-ebda mortalità ma sseħħ, il-lott huwa aċċettabbli, altrimentri għandu jkun miċħud,

— anqas minn 5 % tal-popolazzjoni:

aċċettazzjoni tal-lott.

1.6.4. **Adattazzjoni**

Il-ħut kollu għandu jkun espost għall-ilma tal-kwalità u tat-temperatura li jkunu wżati fit-test għal mill-anqas sebat ijiem qabel ma jintużaw.

▼B

1.6.5. **Proċedura tat-test**

Test tas-sejba tal-medda jista jipprekedi t-test definittiv, sabiex tkun akkwistata l-informazzjoni dwar il-medda tal-konċentrazzjonijiet li għandhom ikunu wżati fit-test ewlieni.

Kontroll wieħed mingħajr is-sustanza tat-test għandu jkun magħmul u, jekk relevanti, kontroll wieħed li jkun fih sustanza awżiljarja għandu wkoll ikun magħmul, b'żieda mas-serje tat-testijiet.

Jiddependi mill-proprjetajiet fiżiċi u kimiċi tal-kompost tat-test, test statiku, semi-statiku jew biċ-ċaqlieq kontinwu għandu jkun magħżul skond kif xieraq, sabiex iwettaq il-kriterja tal-kwalità.

Il-ħut huwa espost għas-sustanza kif deskritt hawn taħt:

— tul ta' żmien: 96 siegħa

— numru ta' l-annimali: mill-anqas 7 kull konċentrazzjoni,

— tankijiet: ta' daqs adattat b'relazzjoni mat-tagħbija rakkommandata,

— tagħbija: tagħbija massima ta' 1 g kull litru għal testijiet statiċi u semi-statiċi hija rakkommandata; għal sistemi ta' ċaqlieq kontinwu, tagħbija għola hija aċċettabbli

— konċentrazzjoni tat-test: Mill-anqas ħames konċentrazzjoninijiet li jiddifferixxu b'fattur kostanti li ma jeċċedix 2,2 u kemm jista jkun possibbli li jkopri l-medda ta' 0 sa 100 % mortalità.

— ilma: ara 1.6.1.2,

— dawl: 12 sa 16-il siegħa ta' dawl kuljum,

— temperatura: xierqa għall-ispeċi (l-Appendiċi 2) imma fi ħdan ± 1 °C skond it-test partikolari,

— konċentrazzjoni ta' ossiġenu mdewweb: mhux anqas minn 60 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja fit-temperatura magħżula,

— ikel: xejn.

Il-ħut ikunu spezzjonati wara l-ewwel 2 sa 4 siegħat u mill-anqas matul intervalli ta' 24 siegħa. Il-ħut huma meqjusa bħala mejta jekk meta jkunu minsusa fil-pedunkula kawdjali ma jipproduċu l-ebda reazzjoni u l-ebda movimenti tan-nifs ma jkunu viżibbli. Il-ħut mejta jkunu mneħħija malli dan ikun osservat u l-mortalitajiet huma reġistrati. Reġistri jinżammu ta' annormalitajiet viżibbli (eż. talf ta' l-ekwilibriju, tibdil fl-imġieba ta' l-għawm, funzjoni respiratorja, pigmentazzjoni, eċċ.).

Il-kejl tal-pH, l-ossiġenu mdewweb u tat-temperatura għandhom jitwettqu ta' kuljum.

Test ta' limitazzjoni

Bl-użu tal-proċeduri deskritti f'dan il-metodu tat-test, test tal-limitazzjoni jista jkun imwettaq fi 100 mg kull litru sabiex ikun muri li l-LC_{50} ikun akbar minn din il-konċentrazzjoni.

Jekk in-natura tas-sustanza tkun tali li konċentrazzjoni ta' 100 mg kull litru fl-ima tat-test ma tistax tkun milħuqha, it-test tal-limitazzjoni għandu jkun imwettaq f'konċentrazzjoni egwali għas-solubbilità tas-sustanza (jew tal-konċentrazzjoni massima li tifforma tixrid stabbli) fil-medja użata (ara wkoll il-punt 1.6.1.1).

▼B

It-test tal-limitazzjoni għandu jkun imwettaq bl-użu ta' minn 7 sa 10 ħutiet, bl-istess numru ta' kontroll(i). (It-teorija binominali tiddetta li meta 10 ħutiet huma wżati b'mortalità żero, ikun hemm 99,9 % affidabbilità li l-LC_{50} huwa akbar mill-konċentrazzjonini użata f'dak it-test tal-limitazzjoni. Bi 7, 8 jew 8 ħutiet, l-assenza tal-mortalità tipprovdi mill-anqas 99 % affidabbilità li l-LC_{50} huwa akbar mill-konċentrazzjoni użata.)

Jekk ikun hemm mortalijiet, studju sħiħ għandu jkun imwettaq. Jekk effetti sub-letali huma osservati, dawn għandhom ikunu reġistrati.

2. **DATA U EVALWAZZJONI**

Għal kull perijodu ta' meta l-osservazzjonijiet kienu reġistrati (24, 48, 72 u 96 siegħa), pinġi l-persentaġġ tal-mortalità għal kull perijodu ta' l-espożizzjoni kif rakkommandat kontra l-konċentrazzjoni fuq karta tal-probabbiltà logaritmika,

Meta possibbli u għal ħin ta' l-osservazzjoni, l-LC_{50} u l-limiti tal-kunfidenza (p = 0,05) għandhom ikunu ikkalkolati bl-użu tal-proċeduri normali; dawn il-valuri għandhom ikunu mqarrba lejn wieħed, l-aktar lejn tnejn, figuri sinifikanti (eżempji tat-tqarrib lejn żewġ figuri: 170 għal 173,5; 0,13 għal 0,127; 1,2 għal 1,21).

F'dawk il-każi meta l-linja magħwġa bil-kurva tal-konċentrazzjoni/-persentaġġ tar-reazzjoni tkun wieqfa wisq sabiex tippermetti l-kalkolazzjoni tal-LC_{50}, estimi grafiċi ta' dan il-valur huma suffiċjenti.

Meta żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi, b'relattività ta' 2,2 jagħtu biss 0 u 100 % mortalità, dawn iż-żewġ valuri huma suffiċjenti sabiex jindikaw il-medda li fiha jkun jidħol il-LC_{50}.

Jekk ikun osservat li l-istabbilità jew l-omoġenità tas-sustanza tat-test ma jistgħux jinzammu dan għandu jkun irrapportat u qies għandu jittieħed fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— informazzjoni dwar il-ħut tat-test (isem xjentifiku, razza, fornitur, xi pre-trattament, daqs u numru użat f'kull konċentrazzjoni tat-test);

— is-sorsi tat-trattib – ilma u l-karatteristiċi kimiċi maġġuri (pH, ebusija, temperatura);

— fil-każ ta' sustanza b'solubilità akwea baxxa, l-metodu tal-preparazzjoni tat-taħlitiet kemm dawk imħejjija lesti u tat-test;

— konċentrazzjoni ta' xi sustanzi awżiljarji;

— lista tal-konċentrazzjonijiet użati u xi informazzjoni disponibbli dwar l-istabbilità tal-konċentrazzjonijiet tal-kimika ittestjata fit-taħlita tat-test;

— jekk analiżi kimika titwettaq, metodi wżati u r-riżultati akkwistati;

— r-riżultati tat-test tal-limitazzjoni, jew imwettaq;

— ir-raġunijiet tal-għażla u d-dettalji tal-proċedura tat-test kif użata (eż. statiku, semi-statiku, rata tad-dożar, rata taċ-ċaqlieq kontinwu, jekk huma mogħti l-arja, t-tagħbija tal-ħut, eċċ.);

▼B

— deskrizzjoni ta' l-apparat tat-test;

— l-organizzazzjoni tad-dawl;

— il-konċentrazzjonijiet ta' l-ossiġenu mdewweb, il-valuri pH u t-temperaturi tat-taħlitiet tat-test kull 24 siegħa;

— evidenza tal-kriterja tal-kwalità li tkun ġiet imwettqa;

— tabella li turi il-mortalità kumulattiva ta' kull konċentrazzjoni u l-kontroll (u l-kontroll bis-sustanza awżiljarja, jekk meħtieġ) f'kull wieħed mill-ħinijiet rakkommandati ta' l-osservazzjoni;

— grafika tal-konċentrazzjoni/persentaġġ tal-kurva tar-reazzjoni fit-tmiem ta' kull test;

— jekk possibbli, l-valuri LC_{50} f'kull wieħed mill-hinijiet rakkommandati ta' l-osservazzjoni (bi 95 % tal-limiti ta' l-affidibbiltà);

— proċedura statistiċi wżati għad-determinazzjoni tal-valuri LC_{50};

— jekk tkun użata sustanza ta' referenza, r-riżultati akkwistati,

— l-ogħla konċentrazzjoni tat-test li ma toħloq l-ebda mortalità matul il-perijodu tat- test;

— l-anqas konċentrazzjoni tat-test li toħloq 100 % mortalità matul il-perijodu tat-test.

4. **REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, Linji ta' Gwida tat-Testijiet 203, Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali u aġġornamenti.

(2) AFNOR – Determinazzjoni tat-tossiċità akuta ta' sustanza mal-Brachydanio rerio -Metodi Statiċi u ta' Caqlieq Kontinwu – NFT 90-303 Ġunju 1985.

(3) AFNOR – Determinazzjoni tat-tossiċità akuta ta' sustanza mal-Salmo gairdneri -Metodu Statiku – ta' Caqlieq Kontinwu – NFT 90-305 Ġunju 1985

(4) ISO 7346/1,/2 u/3 – Kwalità ta' l-ilma – Determinazzjoni tat-tossiċità letali akuta ta' sustanzi għall-ħut ta' l-ilma frisk (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan -Teleostei, Cyprinidae). Parti 1: Metodu statiku. Parti 2: Metodu semi-statiku. Parti 3: Metodu biċ-ċaqlieq kontinwu.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Test tat-tossiċità akuta għall-ħut.

(8) NEN 6506 – Ilma – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata, 1980.

(9) Aġenzija tal-Ħarsien Ambjentali, Metodi għal testijiet tat-tossiċità akuta mal-ħut, makroinvertebrati u amfibji. Il-Kumitat dwar il-Metodi għat-Testijiet tat-Tossiċità ma l-Organiżmi Akwatiċi, Serje tar-Riċerka Ekoloġika EPA-660-75-009, 1975.

(10) Aġenzija tal-Ħarsien Ambjentali, Laboratorju tal-moniteraġġ u sostenn ambjentali, Uffiċju tar-Riċerka u Żvilupp, EPA-600/4-78-012, Jannar 1978.

▼B

(11) Aġenzija tal-Ħarsien Ambjentali, Kontroll tas-Sustanza Tossika, Parti IV, 16 ta' Marzu 1979.

(12) Metodi normali għall-eżaminazzjoni ta' l-ilma u l-ilma skartat, l-erbatax edizjoni, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej, Programm tat-test Inter-Laboratorju li jikkonċerna l- istudju ta' l-ekotossiċità ta' sustanza kimika fir-rigward tal-ħut. Studju KEE D.8368, 22 Marzu 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. u Wilcoxon, F., Metodu simplifikat għall-evalwazzjoni ta' l-esperimenti ta' l-effetti tad-doża, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Metodi Statistiċi fl-Assaġġ Bioloġiku. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Kejl tat-tossiċità tat-tniġġis għall-ħut. Metodi tal-Bioassaġġ għal tossiċità akuta. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Kejl tat-tossiċità tat-tniġġis għall-ħut. II L-utilizzazzjoni u l-applikar tar-riżultati tal-bioaassaġġ. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Metodi għal kalkolazzjoni ta' LC_{50}. Fl-Evalwazzjoni tat-Tossikoloġija u l-Periklu Akwatiku (bl-edizjoni ta' F.I. Mayer u J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, °C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. u Andrews, R.W. Programm tal-computer għal kalkolazzjoni ta' LC50. US EPA.

▼B

Appendiċi 1

Ilma rikostitwit

Eżempju ta' trattib xieraq ta' l-ilma

Il-kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

L-ilma għandu jkun distillat ta' kwalità tajba, jew ilma dejonizzat b'konduttività ta' anqas minn 5 μScm^{-1}.

Apparat għad-distillazzjoni ta' l-ilma m'għandux ikun fih xi partijiet magħmula mir-ramm.

Taħlitiet bil-lest

$CaCI_2$. (Diħidrat tal-klorid tal-kalċju): 11,76 g

Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.

$MgSO_4$. (ħeptaidrat tas-sulfat tal-magneżju): 4,93 g

Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.

$NaHCO_3$ NaHCO3 (karbonat ta' l-idroġenu tas-sodju): 2,59 g

Dewweb fi, fl-ilma u wassal għal litru bl-ilma.

KC1 (klorid tal-putassa): 0,23 g

Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.

Ilma rikostitwit għat-tidwib

Ħawwad 25 ml ta' kull wieħed ta' l-erba taħlitiet bil-lest u wassal sa litru bl-ilma.

Qawwi bl-arja sakemm il-konċentrazzjonini ta' l-ossiġenu mdewweb tkun egwali għall-valur tas-saturizzazzjoni ta' l-arja.

Il-pH għandu jkun 7,8 ± 0,2.

Jekk meħtieġ, aġġusta il-pH bi NaOH (idrossidu tas-sodju) jew HCI (aċidu idrokloriku).

L-ilma tat-trattib hekk ippreparat huwa mwarrab għal madwar 12-il siegħa u l-ebda arja aktar ma tkun miżjuda.

Is-somma tal-jonji Ca u Mg f'din it-taħlita hija ta' 2,5 mmol kull litru. Ir-relattività tal-jonji Ca:Mg hija 4:1 u tal-joni Na:K hija 10:1. L-alkalinità totali ta' din it-taħlita hija 0,8 mmol kull litru.

Kwalunkwe devjazzjoni fil-preparazzjoni ta' l-ilma tat-trattib m'għandhiex tibdel il-komposizzjoni jew il-proprjetajiet ta' l-ilma.

▼B

Appendiċi 2:

Speċi ta' ħut rakkommandat għat–testijiet

Speċje rakkommandati	Medda rakkommandata tat-Temperatura tat-Test (°C)	Tul total rakkommandat ta' l-annimal tat-test (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Ħut-Zebrab	20 sa 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow (ħut ta' l-ilma ħelu)	20 sa 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Karpjun komuni	20 sa 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Killifish ħamrani	20 sa 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 sa 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill	20 sa 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Trota kulurita	12 sa 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Orfe dehbi	20 sa 24	6,0 ± 2,0

Ġabra

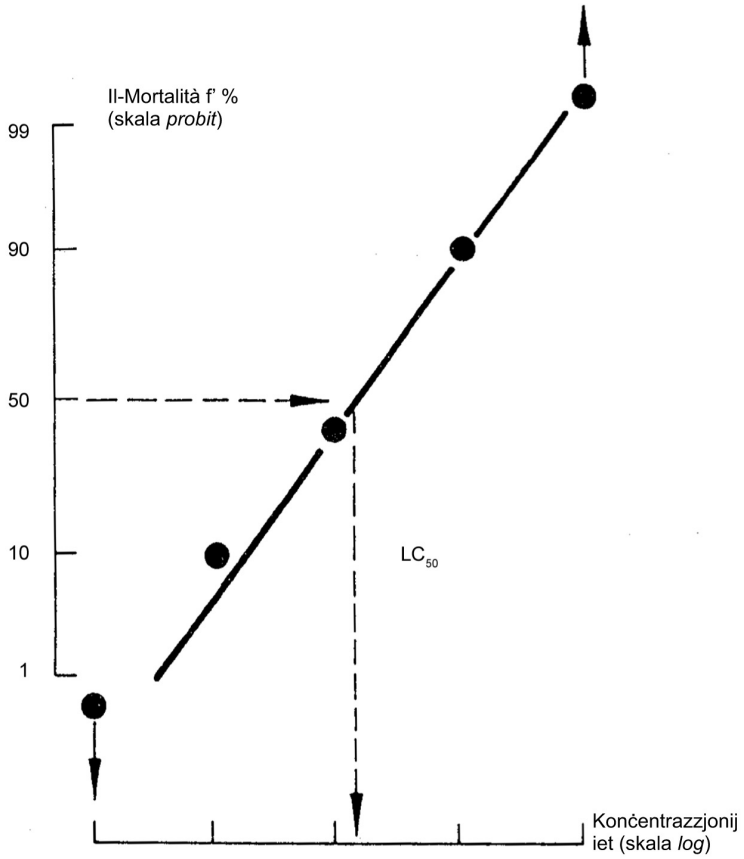
Il-ħut elenkat hawn fuq huma faċli sabiex jitkabbru u/jew faċilment disponibbli matul is-sena kollha. Dawn jistgħu ikunu mkabbra u ikkultivati jew fl-irzizet tal-ħut jew fil-laboratorju, f'kondizzjonijiet ikkontrollati dwar il-mard u l-parassiti, hekk li l-annimal tat-test ikunu b'saħħtu u ta' nisel magħruf. Dan il-ħut huwa disponibbli f'ħafna partijiet tad-dinja.

▼B

Appendiċi 3

Eżempju tal-konċentrazzjonini: persentaġġ tal-mortalità

Eżempju tad-determinazzjoni ta' LC_{50} bl-użu tal-karta *log-probit*



▼B

C.2. **IT-TEST TA' L-IMMOBBILIZZAZZJONI AKUTA *DAPHNIA SP.***

1. **METODU**

Dan il-metodu tat-test ta' immobbilizzazzjoni akuta huwa ekwivalenti għall-OECD TG 202 (2004).

1.1. DAĦLA

Dan il-metodu jiddeskrivi test ta' tossiċità akuta biex jiġu stmati l-effetti tal-kimiċi lejn id-dafnidi. Intużaw metodi tat-test eżistenti safejn possibbli (1)(2)(3).

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Fil-kuntest ta' dan il-metodu, jintużaw dawn id-definizzjonijiet li ġejjin:

EC_{5O}: hija l-konċentrazzjoni stmata li timmobbilizza 50 % tad-dafnidi f'perjodu ta' espożizzjoni dikjarat. Jekk tintuża definizzjoni oħra, din għandha tiġi rrapportata, flimkien mar-riferenzi tagħha.

Immobilizzazzjoni: Dawk l-annimali li huma li ma jistgħux jgħumu fi żmien 15-il sekonda, wara aġitazzjoni bil-mod tal-kontenitur tat-test jitqiesu li huma immobbilizzati (ukoll jekk għadhom jistgħu jċaqalqu l-antenni tagħhom).

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Dafnidi żgħar, ta' eta' ta' inqas minn 24 siegħa fil-bidu tat-test, huma esposti għas-sustanza tat-test f'varjetà ta' konċentrazzjonijiet għal perjodu ta' 48 siegħa. L-immobbilizzazzjoni hija rrekordjata ma' l-24 siegħa u mat-48 siegħa u mqabbla mal-valuri tal-kontroll. Ir-riżultati huma analizzati sabiex jiġi kkalkolat l-EC_{5O} fit-48 siegħa (ara t-taqsima 1,2 għad-definizzjonijiet). Id-determinazzjoni ta' l-EC_{5O} fl-24 siegħa mhijiex obbligatorja.

1.4 L-INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Is-solubbiltà fl-imla u l-pressa tal-fwar tas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufa u għandu jkunu disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fit-taħlitiet tat-test b'effiċjenza ta' l-irkupru rrapportata, u limitu tad-determinazzjoni. Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza, l-istabilità fl-ilma jew fid-dawl, P_{ow} u r-riżultati ta' test għall-bijodegradibbiltà lesta (ara l-metodu C.4).

Nota: Il-gwida għall-ittestjar ta' sustanzi bil-kwalitajiet fiżiċi kimiċi li għamluhom diffiċli li jiġu ttestjati hija pprovduta f' (4).

1.5 IS–SUSTANZI TA' RIFERENZA

Sustanza ta' riferenza tista' tiġi ttestjata għal EC_{5O} bħala mezz biex jiġi żgurat li l-kondizzjonijiet tat-test huma affidabbli. It-tossikanti użati fit-testijiet-ċirku internazzjonali (1)(5) huma rrakkomandati għal dan l-għan ([1]). It-test(ijiet) b'sustanza ta' riferenza għandhom preferibbilment isiru kull xahar u għall-inqas darbtejn fis-sena.

([1]) Ir-riżultati ta' dawn it-testijiet inter-laboratorji u Korriġendum Tekniku għall-ISO 6341 jagħtu EC_{50} – 24 h tad-dikromat tal-potassju ($K_2Cr_2O_7$) fil-firxa bejn 0,6 mg/l u 1,7 mg/l.

▼B

1.6 IL–KRITERJI TAL–KWALITÀ

Biex test ikun validu, jgħoddu dawn il-kriterji operattivi:

— Fil-kontrolli, inkluż il-kontroll li fih l-aġent li jħoll, mhux aktar minn 10 % tad-dafnidi għandhom ikunu ġew immobilizzati;

— Il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu maħlul fl-aħħar tat-test għandha tkun ≥ 3 mg/l fil-kontenituri tal-kontroll u tat-test.

Nota: Għall-ewwel kriterju, mhux aktar minn 10 % tad-dafnidi tal-kontroll għandhom juru immobilizzazzjoni jew sinjali oħra ta' mard jew stress, per eżempju, diskolorazzjoni, mġiba mhux normali bħal li jinqabdu f'wiċċ l-ilma.

1.7 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.7.1. **L-Apparat**

Il-kontenitur tat-test u apparat ieħor li se jiġi f'kuntatt mat-taħlitiet tat-test għandhom ikunu magħmula għal kollox mill-ħġieġ jew minn materjal ieħor li huwa kimikament inert. Il-kontenituri tat-test normalment ikunu tubi tat-test tal-ħġieġ jew tazzi biż-żennuna; għandhom jitnaddfu qabel kull użu bl-użu ta' proċeduri standard tal-laboratorju. Il-kontenituri tat-test għandhom ikunu koperti ħafif biex jitnaqqas it-telf ta' l-ilma minħabba evaporazzjoni u biex jiġi evitat id-dħul tat-trab fit-taħlitiet. Is-sustanzi volatili għandhom l-ewwel jiġu ttestjati f'kontenituri magħluqin li huma mimlijin sa fuq, u li huma kbar biżżejjed biex jiġi prevenut li l-ossiġnu jibda jillimita jew ikun baxx wisq (ara t-taqsima 1.6 u l-ewwel paragrafu tat-taqsima 1.8.3).

Barra minn dan, jintuża xi ftit mit-tagħmir li ġej jew kollu: miter ta' l-ossiġnu (b'mikroelettrodu jew tagħmir ieħor xieraq biex jitkejjel l-ossiġnu f'kampjuni b'volumi baxxi); miter tal-pH; apparat xieraq għall-kontroll tat-temperatura; tagħmir għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni totali tal-karbonu organiku (TOC – *total organic carbon concentration*); tagħmir għad- determinazzjoni tat-talba ta' l-ossiġnu kimiku (COD – *chemical oxygen demand*); tagħmir għad-determinazzjoni ta' l-ebusija, eċċ.

1.7.2 **L-organiżmu tat-test**

Daphnia magna Straus hija l-ispeċje preferuta tat-test għalkemm speċje oħrajn *Daphnia* xierqa jistgħu jintużaw f'dan it-test (eż. *Daphnia pulex*). Fil-bidu tat-test, l-annimali għandu jkollhom inqas minn 24 siegħa u biex titnaqqas il-varjabbiltà, huwa rakkomandat bis-saħħa li ma jkunux l-ewwel friegħ tat-tifqisa. Għandhom ikunu derivati minn tifqisa b'saħħitha (jiġifieri ma juru l-ebda sinjali ta' stress bħall-mortalità għolja, il-preżenza ta' maskili u ephippia, dewmien fil-produzzjoni ta' l-ewwel tifqisa, annimali li jmurilhom il-kulur, eċċ.). L-organiżmu kollha użati għal test partikolari għandhom ikunu oriġinaw mill-istess tifqisa ta' dafnidi. L-annimali tat-tifqisa għandhom jinżammu fil-kondizzjonijiet tal-kultura (dawl, temperatura, medju) simili għal dawk li għandhom jintużaw fit-test. Jekk il-mezz tal-kultura tad-dafnidi li għandu jintuża fit-test huwa differenti minn dak użat għall-kultura rutina tad-dafnidi, hija prattika tajba li jiġi inkluż test ta' l-akklimatizzazzjoni ta' qabel it-test. Għal dak, id-dafnidi tat-tifqisa għandhom jinżammu fl-ilma tat-taħlit fit-temperatura tat-test għal mhux inqas minn 48 siegħa qabel il-bidu tat-test.

▼B

1.7.3. **L-ilma taż-żamma u tat-taħlit**

L-ilma naturali (l-ilma tal-wiċċ u ta' l-art), l-ilma rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat huma aċċettabbli bħala ilma taż-żamma u tat-taħlit jekk id-dafnidi jissopravivu fihom għal kemm idum il-kulturazzjoni, l-akklimatizzazzjoni jew l-ittestjar mingħajr ma jintwerew sinjal ta' stress. Kwalunkwe ilma li jikkonforma mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma tat-taħlit aċċettabbli kif elenkat fl-Anness 1 huwa xieraq bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. L-ilma rikostitwit jista' jsir biż-żjieda ta' ammonti speċifiċi ta' reaġenti ta' grad analitiku magħruf għal ilma deonizzat jew distillat. Eżempji ta' ilma rikostitwit jingħataw f'(1) (6) u fl-Anness 2. Innota li l-medja li fihom aġenti li jikkombinaw jonu tal-metall ma' kompost kimiku (*chelating agent*), bħall-medji M4 u M7 fl-Anness 2, għandhom jiġu evitati sustanzi tat-test li fihom il-metalli. Il-pH għandu jkun fil-firxa ta' 6 sa 9. Hija rrakkomandata l-ebusija bejn 140 u 250 mg/l (bħala $CaCO_3$) għal *Daphnia Magna*, filwaqt li tista' wkoll tkun xierqa ebusija inqas għal speċje oħrajn ta' *Daphnia*. L-ilma tat-taħlit jista' jiġi arjat qabel ma jintuża għat-test sabiex il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu mħallat tkun laqħet is-saturazzjoni.

Jekk jintuża l-ilma naturali, il-parametri tal-kwalità għandhom jitkejlu għall-inqas darbtejn fis-sena jew kull meta huwa ssuspettat li dawn il-karatteristuċi setgħu nbidlu b'mod sinjifikanti (ara l-paragrafu ta' qabel u l-Anness 1). Il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) għandu jsir ukoll. Jekk jintuża ilma tal-vit deklorinat, l-analiżi kuljum tal-klorin hija mixtieqa. JEkk l-ilma tat-taħlit huwa minn għajn ta' l-ilma fil-wiċċ jew fl-art, għandhom jitkejlu l-konduttività u l-karbonu organiku totali (TOC) jew it-talba għall-ossiġnu kimiku (COD).

1.7.4 **It-taħlitiet tat-test**

It-taħlitiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula normalment huma ppreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni ta' stokk. Is-soluzzjonijiet ta' stokk preferibbilment għandhom jiġu ppreparati billi s-sustanza tat-test tinħall fl-ilma tat-taħlit. Sa fejn huwa possibbli, l-użu tas-solventi, l-emulsifikanti jew id-dispersanti għandu jiġi evitat. Madankollu, dawn il-komposti jistgħu jkunu meħtieġa f'xi każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ta' stokk li hija kkonċentrata kif xieraq. Il-gwida dwar solventi, emulsifikanti u d-dispersanti xierqa tingħata f' (4). Fi kwalunkwe każ is-sustanza tat-test fit-taħlitiet tat-test m'għandhiex teċċedi l-limitu ta' solubbiltà fl-ilma tat-taħlita.

It-test għandu jsir mingħajr l-aġġustament tal-pH. Jekk il-pH ma jibqax fil-firxa 6 – 9, imbagħad jista' jsir test ieħor, bl-aġġustament tal-pH tas-soluzzjoni ta' stokk skond dak ta' l-ilma tat-taħlit qabel ma tiżdied is-sustanza tat-test. L-aġġustament tal-pH għandu jsir b'tali mod li l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ta' stokk ma tinbidilx sa livell sinjifikanti u li ma tiġi kkaużata ebda reazzjoni kimika jew preċipitazzjoni tas-sustanza tat-test. Huma ppreferuti HCl u NaOH.

▼B

1.8 IL-PROĊEDURA

1.8.1. **Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.8.1.1. *Il-gruppi tat-test u l-kontrolli*

Il-kontenituri tat-test jimtlew bil-volumi xierqa ta' l-ilma tat-taħlit u t-taħlitiet tas-sustanza tat-test. Il-proporzjon tal-volum ta' arja/ilma għandha tkun identika għall-grupp tat-test u tal-kontroll. Imbagħad id-dafnidi jitqiegħdu fil-kontenituri tat-test. Għall-inqas 20 annimal, preferibbilment maqsuma f'erba' gruppi ta' ħames annimali kull wieħed, għandhom jintużaw għal kull konċentrazzjoni tat-test (jiġifieri volum ta' 10 ml għal ħames dafnidi għal kull vettura tat-test). It-test jista' jsir bl-użu ta' tiġdid semi-statiku jew sistema ta' flow-through meta l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test mhijiex stabbli.

Serje ta' kontroll waħda ta' l-ilma ta' dilwizzjoni kif wkoll, jekk rilevanti, serje ta' kontroll waħda li fiha l-aġent solubilizzanti għandhom isiru flimkien mas-serje tat-trattament.

1.8.1.2 *Il-konċentrazzjonijiet tat-test*

Jista' jsir test biex tinsab il-firxa sabiex tiġi ddeterminata l-firxa ta' konċentrazzjonijiet għat-test definittiv kemm-il darba ma tkunx disponibbli l-informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test. Għal dan l-għan, id-dafnidi huma esposti għal serje ta' konċentrazzjonijiet spazjati ħafna tas-sustanza tat-test. Ħames dafnidi għandhom jiġu esposti għal kull konċentrazzjoni tat-test għal 48 siegħa jew inqas, u ma huma neċessarji ebda replikati. Il-perjodu ta' espożizzjoni jista' jitqassar (eż. 24 siegħa jew inqas) jekk id-data xierqa għall-għan tat-test biex tinsab il-firxa tista' tinkiseb f'inqas żmien.

Għandhom jintużaw għall-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test. Għandhom jiġu rranġati f'serje ġeometriċi b'fattur ta' separazzjoni li preferibbilment ma jeċċedix 2,2. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet. L-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha preferibbilment tirriżulta fl-immobilizzazzjoni ta' 100 fil-mija, u l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa ttestjata għandha preferibbilment ma tagħti ebda effett osservabbli.

1.8.1.3. *Il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni*

It-temperatura għandha tkun bejn 18 °C u 22 °C, u għal kull test uniku għandha tkun kostanti sa ± 1 °C. Huwa rakkomandat ċiklu ta' 16-il siegħa dawl u 8 sigħat dlam. Huwa aċċettabbli wkoll id-dlam totali, speċjalment għas-sustanzi tat-test li mhumiex stabbli fid-dawl. Il-kontenituri tat-test m'għandhomx jiġu arjati matul it-test.

It-test isir mingħajr aġġustament tal-pH. Id-dafnidi m'għandhomx jiġu mitmugħa matul it-test.

1.8.1.4 *Kemm idum it-test*

It-test idum 48 siegħa.

1.8.2 **Osservazzjonijiet**

Kull kontenitur tat-test għandu jiġi vverifikat għal dafnidi immobilizzati fl-24 u fit-24 siegħa wara l-bidu tat-test. (ara t-taqsima 1,2 għad-definizzjonijiet). Minbarra l-immobilità, kwalunkwe mġieba jew dehra mhux normali għandha tiġi rrapportata.

▼B

1.8.3. **Kejl analitiku**

L-ossiġnu imħallat u l-pH jiġu mkejla fil-bidu u fl-aħħar tat-test fil-kontroll(i) u fl-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza. Il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu maħlul fil-kontrolli għandha tkun skond il-kriterji tal-validità (ara t-taqsima 1.6). Il-pH normalment m'għandux ivarja b'aktar minn 1.5 unitajiet fi kwalunkwe test. Normalment it-temperatura tiġi mkejla fil-kontenituri tal-kontroll jew fl-arja ta' l-ambjent u preferibbilment għandha tiġi rreġistrata kontinwament matul it-test, jew, bħala minimu, fil-bidu u fl-aħħar tat-test.

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tiġi mkejla mhux inqas minn fl-ogħla konċentrazzjoni tat-test u f'dik l-aktar baxxa, fil-bidu u fl-aħħar tat-test (4). Huwa rakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejla. Iżda, jekk hemm provi li juru li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test inżammet b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-bidu matul it-test kollu, ir-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri mkejla nominali jew tal-bidu.

1.9 IT-TEST TAL-LIMITU

Bl-użu tal-proċeduri deskritti f'dan il-Metodu, jista' jsir test tal-limitu b'100 mg/l sustanza tat-test jew sa l-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-mezz tat-test (dak li huwa l-aktar baxx fosthom) sabiex jintwera li l-EC_{5O} huwa akbar minn din il-konċentrazzjoni. It-test tal-limitu għandu jsir bl-użu ta' 20 dafnida (preferibbilment maqsuma f'erba' gruppi ta' ħamsa), bl-istess numru fil- kontroll(i). Jekk isseħħ immobilizzazzjoni, għandu jsir studju sħiħ. Għandha tiġi rrekordjata kwalunkwe mġieba osservata li mhijiex normali.

2. **DATA**

Id-data għandha tiġi mqassra f'forma tabulari, li turi għal kull grupp ta' trattament u l-kontroll, l-għadd ta' dafnidi użati, l-immobilizzazzjoni f'kull osservazzjoni. Il-persentaġġ immobbilizzati fl-24 siegħa u fit-48 siegħa huma mpinġija fuq djagramma kontra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Id-data hija analizzata permezz ta' metodi statistiċi xierqa. (eż. analiżi *probit*, eċċ.) biex jiġu kkalkolati l-gradjenti tal-kurvi ta' l-EC_{5O} b'limiti ta' kunfidenza ta' 95 % (p = 0,05) (7) (8).

Fejn il-metodi standard biex jinħadem l- EC_{5O}, ma jgħoddux għaddata miksuba, l-ogħla konċentrazzjoni li ma tikkaġuna ebda immobilità u l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tipproduċi immobilità ta' 100 % għandhom jintużaw bħala approssimazzjoni għall- EC_{5O} (għaliex dan huwa l-medju ġeometriku ta' dawn iż-żewġ konċentrazzjonijiet).

3. **L-IRRAPPORTAR**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi għall-inqas din l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżiċi-kimiċi;

▼B

— data ta' l-identifikazzjoni kimika, inkluża l-purità.

L-ispeċje tat-test:

— l-għajn u l-ispeċje tad-*Daphnia*, min jipprovdi l-għajn (jekk magħruf) u l- kondizzjonijiet tal-kultura użati (inkluża l-għajn, it-tip u l-ammont ta' l-ikel, il-frekwenza ta' l-għalf).

Il-kondizzjonijiet tat-test:

— deskrizzjoni tal-kontenituri tat-test: tip ta' kontenituri, volum tat-taħlita, għadd ta' dafnidi għal kull kontenitur tat-test, għadd ta' kontenituri tat-test (replikati) għal kull konċentrazzjoni;

— metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' stokk u tat-test inkluż l-użu ta' kwalunkwe solvent jew dispersanti, il-konċentrazzjonijiet użati;

— dettalji ta' l-ilma tat-taħlit: il-karatteristiċi tal-kwaliità ta' l-għajn u ta' l-ilma (pH, ebusija, proporzjon Ca/Mg, proporzjon Na/K, alkalinità, konduttività, eċċ.);

— il-kompożizzjoni ta' l-ilma kkostitwit mill-ġdid jekk jintuża;

— il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni: it-temperatura, l-intensità u l-perjodiċità tad- dawl, l- ossiġnu maħlul, il-pH, eċċ.

Riżultati:

— l-għadd u l-persentaġġ ta' dafnidi li ġew immobilizzati jew li wrew xi effetti avversi (inkluża mġieba mhux normali) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament, f'kull ħin ta' osservazzjoni u deskrizzjoni tan-natura ta' l-effetti osservati;

— ir-riżultati u d-data tat-test imwettaq bis-sustanza ta' riferenza, jekk disponibbli;

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test u r-riżultat ta' l-analiżi kollha biex tiġi ddeterminata s-sustanza tat-test fil-kontenituri tat-test; l-effiċjenza ta' l-irkupru u l-limitu tad-determinazzjoni għandhom ukoll jiġu rrapportati;

— il-kejl kollu fiżiku-kimiku tat-temperatura, tal-pH u ta' l-ossiġenu maħlul li sar matul it-test;

— l-EC_{5O} fl-48 siegħa għall-immobbilizzazzjoni b'intervalli ta' kunfidenza u graffs tal-mudell użat għall-kalkolu tagħhom, l-angolatura tal-kurvi tad-doża ta' rispons u l-iżball standard tagħhom; il-proċeduri statistiċi użati għad-determinazzjoni ta' l-EC_{5O}; (dawn l-elementi ta' data għall-immobbilizzazzjoni fl-24 siegħa għandhom jiġu rrapurtati wkoll meta jkunu tkejlu)

— spjegazzjoni ta' kwalunkwe devjazzjoni mill-Metodu tat-Test u jekk id-devjazzjoni affetwatx ir-riżultati tat-test.

4. **REFERENZI**

1. ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850,1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter- laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 -American Society for Testing and Materials. Pp65-84

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

L-ANNESS 1

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAT-TAĦLIT AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjoni
Materja f'partiċelli	< 20 mg/l
Karbonu organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mingħajr ioni	< 1 µg/l
Klorin residwali	< 10 µg/l
Il-pestiċidji organofosfori totali	< 50 ng/l
Il-pestiċidji organofosfori totali flimkien ma' *polychlorinated biphenyls*	< 50 ng/l
Il-klorin organiku totali	< 25 ng/l

▼B

L-ANNESS 2

EŻEMPJI TA' IL-A TAT-TEST KOSTITWIT MILL-ĠDID XIERAQ

Ilma tat-test ISO (1)

Soluzzjonijiet ta' stokk (sustanza waħda)		Biex tipprepara l-ilma kostitwit mill-ġdid, żid dawn il-volumi li ġejjin ta' taħlitiet tat-tifqisiet ma' litru ilma (*)
Susstanza	Ammont miżjud ma' litru ilma (*)	
Calcium chloride $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Sulfat tal-manjeżju $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bikarnobat tas-sodju $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kloridu tal-potassju KCl	0,23 g	25 ml

(*) Ilma ta' safa xierqa, eż. deonizzat, distillat jew *reverse osmosis* b'kondottività li preferibbilment ma teċċedix 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Il-mezz Elendt M7 u M4

L-Akklimazzjoni għall-mezz Elendt M4 u M7

Xi laboratorji esperjenzaw diffikoltà biex jittrasferixxu direttament id-Daphnia għall-mezz M4 u M7. Madankollu, inkiseb xi suċċess bl-akklimazzjoni gradwali, jiġifieri li jiċċaqalqu mill-mezz tagħhom għal 30 % Elendt, u mbagħad għal 60 % Elendt u mbagħad għal 100 % Elendt. Jista' jkun li l-perjodi ta' akklimazzjoni jkunu jeħtieġu li jkunu twal daqs xahar.

Il-preparazzjoni

Element traċċa

Soluzzjonijiet ta' stokk separati (I) ta' elementi traċċi individwali huma l-ewwel ippreparati f'ilma ta' safa xierqa, eż. deonizzat, distillat jew *reverse osmosis*. Minn dawn it-taħlitiet tat-tifqisiet differenti (I) taħlita tat-tifqisiet oħra (II) tiġi ppreparata, li jkun fiha l-elementi traċċi kollha (soluzzjoni kkombinata), jiġifieri:

Taħlita/i tat-tifqisa I (sustanza waħda)	Ammont miżjud ma' lima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal-mezz M4)	Biex tipprepara s-soluzzjoni ta' stokk kkombinata II, żid dan l-ammont li ġej ta' soluzzjoni ta' stokk I ma' l-ilma (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000- darba	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000- darba	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000- darba	1,0	0,25

▼B

Taħlita/i tat-tifqisa I (sustanza waħda)	Ammont miżjud ma' lima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal-mezz M4)	Biex tipprepara s-soluzzjoni ta' stokk kkombinata II, żid dan l-ammont li ġej ta' soluzzjoni ta' stokk I ma' l-ilma (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000- darba	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000- darba	1,0	0,25
NaBr	320	20 000- darba	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000- darba	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000- darba	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000- darba	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000- darba	1,0	1,0
KI	65	20 000- darba	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000- darba	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000- darba	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000- darba	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000- darba	—	—

Kemm it-taħlitiet Na 2 EDTA u $FeSO_4$ huma ppreparati waħdehom, imferrgħin flimkien u awtoklavati mill-ewwel.

Dan jagħti:

Taħlita 2 l EDTA		1 000- darba	20,0	5,0

Mezzi M4 u M7

Il-mezzi M4 u M7 huma ppreparati bl-użu tas-soluzzjoni ta' stokk II, il-makro-nutrienti u l-vitamini kif ġej:

	Ammont miżjud ma' l-ima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal- mezz M4)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokk II miżjuda mal-mezz ippreparat (ml/l)	
			M4	M7
Soluzzjoni ta' stokk II (elementi traċċi kkombinati)		20-darba	50	50
Taħlitiet tat- tifqisa makro nutrienti (sustanza waħda)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000- darba	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000- darba	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000- darba	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000- darba	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000- darba	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000- darba	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000- darba	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000- darba	0,1	0,1

▼B

	Ammont miżjud ma' l-ima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal- mezz M4)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokk II miżjuda mal-mezz ippreparat (ml/l)	
			M4	M7
Taħlita ta' vitamini kkombinati	—	10 000- darba	0,1	0,1
It-taħlita ta' vitamini kkombinati hija ppreparata biż- żjieda tat-3 vitamini ma' litru ta' ilma, kif jidher hawn taħt:				
Thiamine hydrochloride	750	10 000- darba		
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10 000- darba		
Biotine	7,5	10 000- darba		

It-taħlita tal-vitamini kkombinati tiġi maħżuna ffriżata f'alikwoti żgħar. Il-vitamini jiżdiedu mal-mezz ftit qabel l-użu.

N.B: Biex tiġi evitata l-preċipitazzjoni ta' l-imluħ meta jiġu ppreparati il-mezzi kollha, żid l-*aliquots* tat-taħlitiet tat-tifqisiet sa madwar 500 – 800 ml ilma deonizzat u mbagħad imla sa litru.

N.B: L-ewwel pubblikazzjoni tal-mezz M4 tista' tinsab f'Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M6

C.3. ALGA TAL-ILMA HELU U ĊJANOBATTERJI, TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 201 tal-OECD (2006, anness korrett fl-2011). Ġiet identifikata l-ħtieġa li jiġi estiż il-metodu ta' ttestjar biex jinkludi speċijiet addizzjonali u jiġi aġġornat biex jissodisfa r-rekwiżiti għal valutazzjoni tal-periklu u l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi. Din ir-reviżjoni tlestiet abbażi ta' esperjenza prattika estensiva, progress xjentifiku fil-qasam tal-istudji tat-tossiċità algali, u użu regolatorju estensiv, li seħħ mill-adozzjoni oriġinali.

2. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Il-fini ta' dan it-test huwa li jiddetermina l-effetti ta' sustanza kimika fuq it-tkabbir tal-mikroalgi tal-ilma ħelu u/jew iċ-ċjanobatterji. Organiżmi tal-ittestjar li qegħdin jikbru esponenzjalment huma esposti għas-sustanza kimika tat-test f'kulturi tal-lott fuq perjodu li normalment ikun ta' 72 siegħa. Minkejja d-durata relattivament qasira tat-test, l-effetti fuq diversi ġenerazzjonijiet jistgħu jiġu vvalutati.

4. Ir-rispons tas-sistema huwa t-tnaqqis fit-tkabbir f'serje ta' kulturi algali (unitajiet tal-ittestjar) esposti għal diversi konċentrazzjonijiet ta' sustanza kimika tat-test. Ir-rispons huwa evalwat bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni tal-espożizzjoni meta mqabbel mat-tkabbir medju tar-replikat, kulturi tal-kontroll mhux esposti. Għal espressjoni sħiħa tar-rispons tas-sistema għall-effetti tossiċi (sensittività ottimali), il-kulturi huma permessi tkabbir esponenzjali illimitat f'kundizzjonijiet ta' nutrijenti suffiċjenti u dawl kontinwu għal perjodu twil biżżejjed ta' żmien biex jitkejjel it-tnaqqis tar-rata ta' tkabbir speċifiku.

5. It-tkabbir u l-inibizzjoni tat-tkabbir huma kkwantifikati minn kejliet tal-bijomassa algali bħala funzjoni taż-żmien. Il-bijomassa algali hija ddefinita bħala l-piż xott skont il-volum, eż. algi/litri mg ta' soluzzjoni tat-test. Madankollu, il-piż xott huwa diffiċli biex jitkejjel u għalhekk jintużaw parametri sostituti. Minn dawn is-surrogati, ħafna drabi jintuża l-għadd taċ-ċelloli. Parametri ta' surrogati oħra jinkludu l-volum taċ-ċelloli, il-fluworexxenza, id-densità ottika, eċċ. Għandu jkun magħruf fattur ta' konverżjoni bejn il-parametru sostitut imkejjel u l-bijomassa.

6. Dan il-punt ta' tmiem l-ittestjar huwa l-inibizzjoni tat-tkabbir, espress bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa (rata ta' tkabbir speċifika medja) matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Mir-rati medji ta' tkabbir speċifiku rreġistrati f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala l-E_rC_x (eż. E_rC_{50}).

7. Rispons varjabbli addizzjonali użat f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa r-rendiment, li jista' jkun meħtieġ sabiex jiġu ssodisfati rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'xi pajjiżi. Huwa ddefinit bħala l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni neqes il-bijomassa fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni. Mill-prodott reġistrat f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni ġġib magħha x % speċifikat ta' rata ta' inibizzjoni ta' prodott (eż. 50 %) determinata u espressa bħala l-E_yC_x (eż. E_yC_{50}).

8. Barra minn hekk, jistgħu jiġu stabbiliti statistikament il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

▼**M6**

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

9. Informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test li jaf tkun siewja biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test inklużi l-formula strutturali, il-purità, l-istabbiltà fid-dawl, l-istabbiltà fil-kundizzjonijiet tat-test, il-proprjetajiet ta' assorbiment tad-dawl, il-pK_a, u r-riżultati tal-istudji tat-trasformazzjoni li jinkludu l-bijodegradabilità fl-ilma.

10. Is-solubbiltà fl-ilma, il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (P_{ow}) u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun magħrufa u għandu jkun disponibbli metodu vvalidat għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fis-soluzzjonijiet tat-test b'effiċjenza tal-irkupru rrapportata u limitu ta' detezzjoni.

VALIDITÀ TAT-TEST

11. Biex it-test ikun validu, għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin:

— Il-bijomassa fil-kulturi tal-kontroll għandhom ikunu żdiedu b'mod esponenzjali b'fattur ta' mill-anqas 16 fi żmien il-perjodu ta' ttestjar ta' 72 siegħa. Din tikkorrispondi għal rata ta' tkabbir speċifika ta' 0,92 ġurnata^{-1}. Għall-ispeċijiet użati l-iktar frekwentement, ir-rata ta' tkabbir ġeneralment tkun sostanzjalment ogħla (ara l-Appendiċi 2). Dan il-kriterju jaf ma jiġix sodisfatt meta jintużaw speċijiet li jikbru iktar bil-mod minn dawk elenkati fl-Appendiċi 2. F'dan il-każ, il-perjodu tal-ittestjar għandu jiġi estiż biex jinkiseb tal-inqas tkabbir 16-il darba ikbar fil-kulturi tal-kontroll, filwaqt li t-tkabbir għandu jkun esponenzjali matul il-perjodu tal-ittestjar. Il-perjodu tal-ittestjar jista' jitqassar għal tal-inqas 48 siegħa biex jinżamm tkabbir illimitat u esponenzjali matul it-test sakemm jintlaħaq il-fattur ta' multiplikazzjoni minimu ta' 16.

— Il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni għal rati ta' tkabbir speċifiċi skont is-sezzjoni (jiem 0-1, 1-2 u 2-3, għal testijiet ta' 72 siegħa) fil-kulturi ta' kontroll (Ara l-Appendiċi 1 taħt "koeffiċjent ta' varjazzjoni") ma għandux jaqbeż il-35 %. Ara l-paragrafu 49 għall-kalkolu tar-rata ta' tkabbir speċifika skont is-sezzjoni. Dan il-kriterju japplika għall-valur medju tal-koeffiċjenti ta' varjazzjoni kkalkolati għall-kulturi tal-kontroll irreplikati.

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-rati ta' tkabbir speċifiċi medji matul il-perjodu tal-ittestjar kollu fil-kulturi ta' kontroll tar-repliki ma għandux jaqbeż 7 % fit-testijiet b'Pseudokirchneriella subcapitata u Desmodesmus subspicatus. Għal speċijiet oħrajn ittestjati inqas spiss, il-valur ma għandux jaqbeż l-10 %.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

12. Is-sustanza (jew sustanzi) ta' referenza bħal 3,5-diklorofenol użata fir-ringtest internazzjonali (1), tista' tiġi ttestjata bħala mezz ta' verifikar tal-proċedura tal-ittestjar. Id-dikromat tal-potassju jista' jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza għal alga ħadra wkoll. Idealment tiġi ttestjata sustanza kimika ta' referenza mill-anqas darbtejn fis-sena.

APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

13. Dan il-metodu ta' ttestjar iktar faċli jiġi applikat għal sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma li, fil-kundizzjonijiet tat-test, aktarx li jibqgħu fl-ilma. Għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi li huma volatili, adsorbenti ħafna, ikkuluriti, b'solubbiltà baxxa fl-ilma jew sustanzi kimiċi li jistgħu jaffettwaw

▼M6

id-disponibbiltà ta' nutrijenti jew minerali fil-midjum tat-test, jistgħu jkunu meħtieġa ċerti modifiki tal-proċedura deskritta (eż. sistema magħluqa, kundizzjonar tar-reċipjent tat-test). Hija pprovduta gwida dwar xi modifiki xierqa f'(2) (3) u (4).

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Apparat

14. Ir-reċipjenti tat-test u apparat ieħor li sejrin jiġu f'kuntatt mas-soluzzjonijiet tat-test għandhom ikunu magħmula kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. L-oġġetti għandhom jinħaslu sew biex jiġi żgurat li ebda kontaminant organiku jew inorganiku ma jinterferixxi mat-tkabbir tal-alga jew il-kompożizzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test.

15. Ir-reċipjenti tat-test normalment ikunu fliexken tal-ħġieġ b'qisien li jippermettu volum suffiċjenti ta' kultura għall-kejliet matul it-test u trasferiment suffiċjenti ta' massa ta' CO_2 mill-atmosfera (ara l-paragrafu 30). Ta' min jinnota li l-volum tal-likwidu għandu jkun biżżejjed għal determinazzjonijiet analitiċi (ara l-paragrafu 37).

16. Barra minn hekk, jaf ikun meħtieġ it-tagħmir li ġej jew kollu kemm hu:

— Apparat tal-kultura: huwa rakkomandat armadju jew kompartiment, fejn tista' tinżamm it-temperatura ta' inkubazzjoni magħżula fi ± 2 °C.

— Strumenti ta' kejl ħfief: ta' min jgħid li l-metodu ta' kejl tal-intensità tad-dawl, u b'mod partikolari t-tip ta' riċettur (kollettur), jista' jaffettwa l-valur imkejjel. Idealment, il-kejliet għandhom isiru permezz ta' riċettur (4 π) sferiku (li jirrispondi għal dawl dirett u rifless mill-angoli kollha 'l fuq u taħt il-pjan tal-kejl), jew riċettur π 2 (li jirrispondi għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan tal-kejl).

— Apparat biex tiġi ddeterminata l-bijomassa algali. L-għadd taċ-ċelloli, li huwa l-iktar parametru sostitut użat spiss għall-bijomassa algali, jista' jsir permezz ta' kontantur elettroniku tal-partiċelli, mikroskopju b'kompartiment tal-għadd, jew ċitometru tal-fluss. Surrogati tal-bijomassa oħrajn jistgħu jitkejlu permezz ta' ċitometru tal-fluss, fluworimetru, spettrofotometru jew kulurimetru. Fattur ta' konverżjoni li jirrelata l-għadd ta' ċelloli mal-piż xott huwa siewi għall-kalkolu. Sabiex jiġu pprovduti miżuri siewja f'konċentrazzjonijiet baxxi tal-bijomassa meta jintuża spettrofotometru, jaf ikun meħtieġ li jintużaw kuvetti b'passaġġ tad-dawl ta' mill-anqas 4 cm.

Organiżmi tat-test

17. Jistgħu jintużaw diversi speċijiet ta' mikroalgi li ma jaggregawx u ċjanobatterji. Intwera li r-razez elenkati fl-Appendiċi 2 huma xierqa bil-proċedura tal-ittestjar speċifikata f'dan il-metodu ta' ttestjar.

18. Jekk jintużaw speċijiet oħrajn, għandha tiġi rrapportata r-razza u/jew l-oriġini. Ikkonferma li t-tkabbir esponenzjali tal-alga tat-test magħżula tista' tinżamm matul il-perjodu ta' ttestjar fil-kundizzjonijiet eżistenti.

Midjum ta' tkabbir

19. Huma rakkomandati żewġ midjums ta' tkabbir alternattivi, il-midjum tal-AAP u l-OECD u. Il-kompożizzjonijiet ta' dawn il-midjums huma indikati fl-Appendiċi 3. Kun af li l-valur tal-pH inizjali u l-kapaċità ta' bbaferjar (li tirregola ż-żieda fil-pH) taż-żewġ midjums huma differenti. Għalhekk, ir-riżultati tat-testijiet jaf ikunu differenti skont il-midjum użat, b'mod partikolari meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi jonizzanti.

▼M6

20. Jaf tkun meħtieġa modifika tal-midjums ta' tkabbir għal ċerti finijiet, eż. meta jiġu ttestjati metalli u aġenti kelanti jew meta jsir ittestjar f'valuri tal-pH differenti. L-użu ta' midjum immodifikat għandu jiġi deskritt fid-dettall u ġġustifikat (3) (4).

Konċentrazzjoni tal-bijomassa inizjali

21. Il-bijomassa inizjali fil-kulturi tat-test għandha tkun l-istess fil-kulturi tat-test kollha u baxxa biżżejjed biex tippermetti tkabbir esponenzjali matul il-perjodu ta' inkubazzjoni kollu mingħajr ir-riskju ta' tnaqqis fin-nutrijenti. Il-bijomassa inizjali ma għandhiex taqbeż iż-0,5 mg/l bħala piż xott. Huma rakkomandati l-konċentrazzjonijiet ta' ċelloli inizjali li ġejjin:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 – 10^4$ ċelloli/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$ ċelloli/ml
Navicula pelliculosa	10^4 ċelloli/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 ċelloli/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 – 10^5$ ċelloli/ml

Konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test

22. Il-medda tal-konċentrazzjoni li fiha l-effetti x'aktarx li jseħħu hija determinata fuq il-bażi tar-riżultati mit-testijiet tas-sejbien tal-medda. Għat-test finali definittiv, għandhom jintgħażlu tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet, irranġati f'serje ġeometrika b'fattur li ma jaqbiżx it-3.2. Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru kurva konċentrazzjoni rispons stabbli, jista' jkun iġġustifikat fattur ogħla. Idealment, is-serje ta' konċentrazzjoni għandha tkopri l-medda li tikkawża inibizzjoni ta' 5-75 % tar-rata ta' tkabbir tal-alga.

Repliki u kontrolli

23. Id-disinn tat-test għandu jinkludu tliet repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test. Jekk ma jkunx meħtieġ li tiġi ddeterminata l-NOEC, id-disinn tat-test jista' jinbidel biex jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. In-numru ta' repliki tal-kontroll għandu jkun tal-inqas tlieta, u idealment għandu jkun id-doppju tan-numru ta' repliki użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.

24. Jista' jitħejja sett separat ta' soluzzjonijiet tat-test għal determinazzjonijiet analitiċi tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafi 36 u 38).

25. Meta jintuża solvent biex tinħall is-sustanza kimika tat-test, kontrolli addizzjonali li fihom is-solvent fl-istess konċentrazzjoni kif użat fil-kulturi tat-test għandhom jiġu inklużi fid-disinn tat-test.

Tħejjija tal-kultura tal-inokulu

26. Sabiex l-alga tal-ittestjar tiġi adattata għall-kundizzjonijiet tat-test u jiġi żgurat li l-algi huma f'fażi ta' tkabbir esponenzjali meta jintużaw biex jinokulaw is-soluzzjonijiet tat-test, titħejja kultura tal-inokulu fil-midjum tat-test bejn jumejn u 4 ijiem qabel jibda t-test. Il-bijomassa algali għandha tiġi aġġustata sabiex tippermetti li jkun hemm tkabbir esponenzjali fil-kultura tal-inokulu sakemm jibda t-test. Inkuba l-kultura tal-inokulu fl-istess kundizzjonijiet bħall-kulturi tat-test. Kejjel iż-żieda fil-bijomassa fil-kultura

▼M6

tal-inokulu biex tiżgura li t-tkabbir huwa fi ħdan il-medda normali għarrazza tal-ittestjar f'kundizzjonijiet ta' kulturi. Eżempju tal-proċedura għall-kulturi algali huwa deskritt fl-Appendiċi 4. Biex jiġu evitati diviżjonijiet ta' ċelloli sinkroniċi matul it-test jaf ikun meħtieġ pass ieħor ta' propagazzjoni tal-kultura tal-inokulu.

Tħejjija tas-soluzzjonijiet tat-test

27. Is-soluzzjonijiet tat-test kollha għandu jkun fihom l-istess konċentrazzjonijiet tal-midjum ta' tkabbir u l-bijomassa inizjali tal-alga tat-test. Is-soltu, is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin jitħejjew billi titħallat soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test b'midjum ta' tkabbir u kultura tal-inokulu. Is-soluzzjonijiet ewlenin normalment jitħejjew billi s-sustanza kimika titħalla tinħall fil-midjum tat-test.

28. Jistgħu jintużaw solventi, bħal aċeton, alkoħol t-butil u dimetil formamid bħala portaturi sabiex jiżdiedu sustanzi kimiċi b'solubbiltà baxxa mal-midjum tat-test (2)(3). Il-konċentrazzjoni ta' solvent ma għandhiex taqbeż il-100 µl/l, u l-istess konċentrazzjoni ta' solvent għandha tiżdied mal-kulturi kollha (inkluż il-kontrolli) fis-serje tat-test.

Inkubazzjoni

29. Agħtti r-reċipjenti tat-test b'tappijiet li tgħaddi l-arja minnhom. Ir-reċipjenti jitħażżu u jitqiegħdu fl-apparat tal-kulturi. Matul it-test huwa meħtieġ li l-algi jinżammu f'sospensjoni u sabiex tiffaċilita trasferiment ta' CO_2. Għal dan il-għan, għandek theżżeż jew tħawwad b'mod konsistenti. Il-kulturi għandhom jinżammu f'temperatura fil-medda ta' 21 sa 24 °C, ikkontrollati f'± 2 °C. Għal speċijiet għajr dawk elenkati fl-Appendiċi 2, eż. speċijiet tropikali, jaf ikunu xierqa temperaturi ogħla, sakemm jistgħu jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità. Huwa rakkomandat li l-flasks jitqiegħdu b'mod każwali u li jerġgħu jiġu pożizzjonati mill-ġdid kuljum fl-inkubatur.

30. Il-pH tal-midjum ta' kontroll ma għandux jiżdied b'aktar minn 1,5 unitajiet matul it-test. Għal metalli u sustanzi kimiċi li parzjalment jonizzaw b'pH madwar il-pH tat-test, jista' jkun meħtieġ li jiġi limitat it-tifrix tal-pH biex jinkisbu riżultati riproduċibbli u ddefiniti sew. Differenza ta' < 0,5 pH unità hija teknikament fattibbli u tista' tiġi miksuba billi tiġi żgurata rata ta' trasferiment ta' massa ta' CO_2 adegwata mill-arja tal-madwar tas-soluzzjoni tat-test, eż. billi tiżdied ir-rata taċ-ċaqlieq. Possibilità oħra hija li titnaqqas id-domanda għal CO_2 billi titnaqqas il-bijomassa tal-bidu jew it-tul tat-test.

31. Il-wiċċ fejn il-kulturi huma inkubati għandu jingħata illuminazzjoni fluworexxenti, uniformi, kontinwa, eż. tat-tip "cool-white" jew "daylight". Razez ta' algi u ċjanobatterji jvarjaw fir-rekwiżti tad-dawl tagħhom. L-intensità tad-dawl għandha tintgħażel biex taddatta għall-organiżmu tat-test użat. Għal speċijiet rakkomandati ta' algi ħodor, agħżel l-intensità tad-dawl fil-livell tas-soluzzjonijiet tat-test mill-medda ta' 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ meta titkejjel fil-medda ta' tul ta' mewġa fotosintetikament effikaċi ta' 400 – 700 nm permezz ta' riċettur xieraq. Xi speċijiet, b'mod partikolari *Anabaena flos-aquae*, jikbru sew f'intensitajiet tad-dawl iktar baxxi u jaf issirilhom ħsara f'intensitajiet għolja. Għal dawn l-ispeċi għandha tintgħażel intensità ta' dawl medja fl-isfera ta' 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Għal strumenti ta' kejl tad-dawl ikkalibrati fil-lux, medda ekwivalenti ta' 4 440 – 8 880 lux għal dawl cool white tikkorrispondi bejn wieħed u ieħor għall-intensità tad-dawl rakkomandata 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Żomm l-intensità tad-dawl fi ħdan ± 15 % mill-intensità tad-dawl medja fuq iż-żona tal-inkubazzjoni.

▼M6

Durata tat-test

32. Normalment it-test jieħu 72 siegħa. Madankollu, jistgħu jintużaw durati tat-test iqsar jew itwal diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validita kollha fil-paragrafu 11.

Kejl u determinazzjonijiet analitiċi

33. Il-bijomassa algali f'kull flask hija ddeterminata tal-inqas kuljum matul il-perjodu tal-ittestjar. Jekk isiru miżuri fuq volumi żgħar imneħħija mis-soluzzjoni tat-test bil-pipetta, dawn ma għandhomx jiġu ssostitwiti.

34. Il-kejl tal-bijomassa jsir bl-għadd manwali taċ-ċelloli minn mikroskopju jew apparat elettroniku li jgħodd il-partiċelli (minn għadd taċ-ċelloli/jew bijovolum). Jistgħu jintużaw tekniki alternattivi, eż. ċitometrija tal-fluss, fluworexxenza klorofilljana *in vitro* jew *in vivo* (5) (6), jew densità ottika jekk tista' tintwera korrelazzjoni sodisfaċenti tul il-medda ta' bijomassa li sseħħ fit-test.

35. Kejjel il-pH tas-soluzzjonijiet fil-bidu u fl-aħħar tat-test.

36. Sakemm tkun disponibbli proċedura analitika għad-determinazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-medda tal-konċentrazzjoni użata, is-soluzzjonijiet tat-test għandhom jiġu analizzati biex jiġu vverifikati l-konċentrazzjonijiet u ż-żamma inizjali tal-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni matul it-test.

37. Analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fl-aħħar tat-test tat-test ta' konċentrazzjoni għolja u baxxa, u konċentrazzjoni madwar il-mistennija EC_{50} tista' tkun suffiċjenti fejn x'aktarx il-konċentrazzjonijiet esposti jvarjaw inqas minn 20 % mill-valuri nominali matul it-test. Hija rakkomandata analiżi tal-konċentrazzjonijiet tat-test kollha fil-bidu u fi tmiem tat-test, meta ma jkunx probabbli li l-konċentrazzjonijiet jibqgħu fi ħdan it-80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali. Għal sustanzi kimiċi tat-test volatili, mhux stabbli, adsorbenti ħafna huma rakkomandati kampjuni addizzjonali għall-analiżi f'intervalli ta' 24 siegħa matul il-perjodu ta' espożizzjoni sabiex jiġi ddefinit aħjar it-telf tas-sustanza kimika tat-test. Għal dawn is-sustanzi kimiċi, jaf ikunu meħtieġa repliki żejda. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test tista' titwettaq biss fuq reċipjent tar-repliki wieħed f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tar-reċipjenti miġbura mir-replikat).

38. Il-midjums tal-ittestjar imħejjija speċifikament għall-analiżi tal-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni matul it-test għandhom jiġu ttrattati bl-istess mod bħal dawk użati għall-ittestjar, jiġifieri għandhom jiġu inokulati b'algi u inkubatur fl-istess kundizzjonijiet. Jekk tkun meħtieġa analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test maħlula, jaf tkun meħtieġa separazzjoni tal-alga mill-midjum. Idealment, is-seperazzjoni għandha issir b'ċentrifugazzjoni b'forza-g baxxa, suffiċjenti biex tissettja l-alga.

39. Jekk ikun hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li qiegħda tiġi ttestjata nżammet b'mod sodisfaċenti fi ħdan 20 % tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, l-analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla ma tkunx fi ħdan il-medda ta' ± 20 %, l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja ġeometrika matul l-espożizzjoni jew fuq il-mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (3) (7).

▼M6

40. It-test ta' inibizzjoni tat-tkabbir tal-alga huwa sistema ta' ttestjar iktar dinamiku mill-bidċa l-kbira tat-testijiet tat-tossiċità akkwatika għal terminu qasir l-oħrajn. Bħala konsegwenza, jaf ikun diffiċli tiddefinixxi l-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni attwali, speċjalment għall-adsorbiment ta' sustanzi kimiċi ttestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. F'tali każijiet, l-għajbien tas-sustanza kimika tat-test mis-soluzzjoni b'adsorbiment mal-bijomassa algali li dejjem tiżdied ma jfissirx li din tintilef mis-sistema tat-test. Meta jiġi analizzat ir-riżultat tat-test, għandu jiġi ċċekkjat jekk tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test matul it-test huwiex akkumpanjat minn tnaqqis fl-inibizzjoni tat-tkabbir. Jekk dan ikun il-każ, tista' tiġi kkunsidrata l-applikazzjoni ta' mudell xieraq li jiddeskrivi t-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (7). Jekk le, jaf ikun xieraq li tibbaża l-analiżi tar-riżultati fuq il-konċentrazzjonijiet (nominali jew imkejla) inizjali.

Osservazzjonijiet oħra

41. Għandha titwettaq osservazzjoni mikroskopika biex tiġi vverifikata dehra normali u sana ta' kultura tal-inokulu u biex tiġi osservata kwalunkwe dehra anormali tal-alga (peress li jaf tkun ikkawżata mill-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test) fi tmiem it-test.

Test tal-limitu

42. F'ċerti ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza kimika tat-test ma għandha ebda effetti tossiċi f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-midjum tat-test (irrispettivament minn liema huwa l-inqas), jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi tqabbil tar-risponsi fi grupp ta' kontroll u grupp ta' trattament partikolari (100 mg/l jew konċentrazzjoni daqs il-limitu ta' solubbiltà). Huwa rakkomandat ħafna li dan jiġi appoġġjat minn analiżi tal-konċentrazzjoni tal-espożizzjoni. Japplikaw kull kundizzjoni tat-test u kriterju ta' validità deskritti preċedentement għal test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li n-numru ta' repliki tat-trattament għandhom ikunu tal-inqas sitta. Il-varjabbli tar-rispons fil-grupp ta' kontroll u trattament jistgħu jiġu analizzati permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-medji, eż. Test-t ta' Student. Jekk il-varjanzi taż-żewġ gruppi ma jkunux l-istess, għandu jsir test-t aġġustat għal varjanzi mhux indaqs.

DEJTA U RAPPORTAR

Ipplottjar tal-kurvi tat-tkabbir

43. Il-bijomassa fir-reċipjenti tat-test, tista' tiġi espressa f'unitajiet tal-parametru sostitut użat għall-kejl (eż. in-numru ta' ċelloli, fluworexxenza).

44. Indika l-konċentrazzjoni ta' bijomassa stmata fil-kulturi tat-test u l-kontrolli flimkien mal-konċentrazzjonijiet tal-materjal tat-test u l-ħinijiet tal-kejl, irreġistrata b'riżoluzzjoni ta' mill-anqas sigħat sħaħ, biex jiġu prodotti plottijiet ta' kurvi ta' tkabbir. Kemm l-iskali logaritmiċi kif ukoll l-iskali lineari jistgħu jkunu utli f'dan l-istadju, iżda l-iskali logaritmiċi huma obbligatorji u ġeneralment jagħtu preżentazzjoni aħjar tal-varjazzjonijiet fil-mudell ta' tkabbir matul il-perjodu tal-ittestjar. Ta' min jinnota li tkabbir esponenzjali jipproduċi linja dritta meta jiġi pplottjat fuq skala logaritmika, u inklinazzjoni tal-linja (gradjent) tindika r-rata ta' tkabbir speċifika.

45. Permezz tal-plottijiet, eżamina jekk il-kulturi ta' kontroll jikbrux b'mod esponenzjali bir-rata mistennija matul it-test kollu. Eżamina l-punti ta' dejta kollha u d-dehra tal-graffs b'mod kritiku u ċċekkja d-dejta mhux ipproċessata u l-proċeduri għall-iżbalji possibbli. Iċċekkja b'mod partikolari kwalunkwe punt ta' dejta li jidher li jiddevja bi żball sistematiku. Jekk ikun ovvju li l-iżbalji proċedurali jistgħu jiġu identifikati u/jew jitqiesu probabbli ħafna, il-punt ta' dejta speċifiku huwa mmarkat minn outlier u mhuwiex inkluż f'analiżi statistika sussegwenti. (Konċentrazzjoni algali żero

▼M6

f'wieħed miż-żewġ jew tliet reċipjenti tar-repliki tista' tindika li r-reċipjent ma kienx inokulat b'mod korrett, jew tnaddaf b'mod mhux xieraq). Iddikjara r-raġunijiet għar-rifjut ta' punt ta' dejta bħala outlier fir-rapport tat-test. Ir-raġunijiet aċċettati huma biss żbalji proċedurali (rari) u mhux sempliċi preċiżjoni ħażina. Il-proċeduri tal-istatistika għall-identifikazzjoni tal-outlier huma ta' użu limitat għal din it-tip ta' problema u ma jistgħux jieħdu post il-ġudizzju tal-esperti. Idealment l-outliers (immarkati bħala tali) għandhom jinżammu fost il-punti ta' dejta murija fi kwalunkwe preżentazzjoni ta' dejta grafika jew tabulari sussegwenti.

Varjabbli ta' rispons

46. L-iskop tat-test huwa li jiddetermina l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir tal-alga. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli ta' rispons, peress li ġurisdizzjonijiet differenti għandhom preferenzi u ħtiġijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli fil-ġurisdizzjonijiet kollha, l-effetti għandhom jiġu evalwati permezz taż-żewġ varjabbli tar-rispons (a) u (b) deskritti hawn taħt.

(a) Rata ta' tkabbir speċifika medja: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat abbażi taż-żieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu tal-ittestjar, espressa għal kull jum

(b) Rendiment: dan il-varjabbli tar-rispons huwa l-bijomassa fi tmiem it-test li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu.

47. Ta' min jinnota li l-valuri tat-tossiċità kkalkolati permezz ta' dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma jistgħux jitqabblu u din id-differenza għandha tiġi rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) ikunu ġeneralment ogħla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-Metodu ta' ttestjar jiġu rrispettati, minħabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Dan ma għandux jiġi interpretat bħala d-differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, iżda sempliċement li li l-valuri huma matematikament differenti. Il-kunċett ta' rata ta' tkabbir speċifika medja huwa bbażat fuq il-mudell ta' tkabbir esponenzjali tal-alga f'kulturi mhux limitati, fejn it-tossiċità hija stmata abbażi tal-effetti fuq ir-rata ta' tkabbir, mingħajr ma tiddependi fuq il-livell assolut tar-rata ta' tkabbir speċifika tal-kontroll, il-gradjent tal-kurva konċentrazzjoni rispons jew fuq id-durata tat-test. B'kuntrast, ir-riżultati bbażati fuq il-varjabbli tar-rispons tar-rendimentjiddependu fuq dawn il-varjabbli l-oħra kollha. E_yC_x huwa dipendenti fuq ir-rata speċifika ta' tkabbir tal-ispeċi ta' alka użata fit-test u fuq ir-rata massima ta' tkabbir speċifiku li tista' tvarja bejn speċijiet u kif ukoll bejn razez differenti ta' alka. Dan ir-rispons varjabblima għandux jintuża għat-tqabbil tas-sensittività għat-tossikanti fost l-ispeċijiet ta' algi jew anki razez differenti. Filwaqt li l-użu tar-rata ta' tkabbir speċifika medja għall-istima tat-tossiċità huwa ppreferut xjentifikament, l-istimi tat-tossiċità ibbażati fuq ir-rendimenthuma inklużi wkoll f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti regolatorji attwali f'xi pajjiżi.

Rata ta' tkabbir medja

48. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għal perjodu speċifiku hija kkalkolata bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa mill-ekwazzjoni għal kull reċipjenti uniku tal-kontrolli u t-trattamenti [1]:

▼**M6**

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{jum}^{-1}) \qquad [1],$$

fejn:

μ_{i-j} hija r-rata medja speċifika ta' tkabbir minn ħin i sa j;

X_i hija l-bijomassa fil-ħin *i*;

X_j hija l-bijomassa fil-ħin *j*;

Għal kull grupp ta' trattament u kull grupp ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza.

49. Ikkalkola r-rata ta' tkabbir speċifika medja matul id-durata kollha tat-test (normalment 0-3 ijiem), permezz tal-bijomassa inokulata nominalment bħala l-valur tal-bidu iktar minn valur tal-bidu mkejjel, peress li b'dan il-mod, normalment tinkiseb iktar preċiżjoni. Jekk it-tagħmir użat għall-kejl tal-bijomassa jippermetti determinazzjoni preċiża biżżejjed tal-bijomassa tal-inokulu (eż. citometru tal-fluss) allura tista' tintuża l-konċentrazzjoni tal-bijomassa inizjali mkejla. Ivvaluta wkoll ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni, ikkalkolata bħala r-rati ta' tkabbir speċifiċi għal kull jum matul il-kors tat-test (0-1, 1-2 u 2-3 jiem) u eżamina jekk ir-rata ta' tkabbir tal-kontroll tibqax kostanti (ara l-kriterji tal-validità, paragrafu 11). Rata ta' tkabbir speċifika sinifikament inqas fl-ewwel jum mir-rata ta' tkabbir speċifika medja totali tista' tindika fażi latenti. Filwaqt li fażi latenti tista' titnaqqas u prattikament tiġi eliminata f'kulturi tal-kontroll bi propagazzjoni xierqa tal-prekultura, fażi latenti f'kulturi esposti tista' tindika rkupru wara stress tossiku inizjali jew tnaqqis fl-espożizzjoni minħabba telf ta' sustanza kimika tat-test (inkluż sorbiment fil-bijomassa algali) wara l-espożizzjoni inizjali. Għalhekk ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni tista' tiġi vvalutata sabiex jiġu evalwati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test li jseħħu fil-perjodu ta' espożizzjoni. Differenzi sostanzjali bejn ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni u r-rata ta' tkabbir medja jindikaw devjazzjoni minn tkabbir esponenzjali kostanti u li hija ggarantita eżaminazzjoni mill-qrib tal-kurvi ta' tkabbir.

50. Ikkalkola l-inibizzjoni perċentwali tar-rata ta' tkabbir għal kull replikat ta' trattament mill-ekwazzjoni [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

fejn:

$\%I_r$ = inibizzjoni perċentwali fir-rata ta' tkabbir speċifika medja;

μ_C = valur medju għal rata medja ta' tkabbir speċifiku (μ) fil-grupp ta' kontroll;

μ_T = rata medja ta' tkabbir speċifiku għar-replika ta' trattament;

51. Meta biex jitħejjew is-soluzzjonijiet tat-test jintużaw solventi, għandhom jintużaw il-kontrolli bis-solventi u mhux ili l-kontrolli bla solventi fil-kalkolu ta' inibizzjoni perċentwali.

Rendiment

52. Ir-rendiment huwa kkalkolat bħala l-bijomassa fi tmiem it-test li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għal kull reċipjent uniku ta' kontrolli u trattamenti. Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rendiment flimkien mal-istimi tal-varjanza. Il-persentaġġ ta' inibizzjoni fil-prodott ($\%I_y$) jista' jiġi kkalkulat għal kull replika ta' trattament kif ġej:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

fejn:

$\%\ I_y$ = inibizzjoni perċentwali tar-rendiment;

Y_C = valur medju għall-prodott fil-grupp ta' kontroll;

Y_T = valur għall-prodott għar-replika ta' trattament.

Ipplottjar tal-kurva konċentrazzjoni rispons

53. Ipplottja l-perċentwali tal-inibizzjoni mal-logaritma tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u eżamina l-plott bir-reqqa, filwaqt li tinjora kwalunkwe tali punt ta' dejta li ġie individwat bħala outlier fl-ewwel fażi. Għaddi linja ċara mill-punti ta' dejta b'għajnejk jew b'interpolazzjoni bil-kompjuter biex tieħu idea tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons, u mbagħad kompli b'metodu iktar iddettaljat, idealment metodu statistiku kompjuterizzat. Skont l-użu intiż tad-dejta, il-kwalità (preċiżjoni) u l-ammont ta' dejta, kif ukoll id-disponibblità ta' għodda ta' analiżi tad-dejta, jista' jiġi deċiż (u xi drabi ġġustifikat sew) li titwaqqaf l-analiżi tad-dejta f'dan l-istadju u sempliċement jinqraw il-figuri prinċipali EC_{50} u EC_{10} (u/jew EC_{20}) mill-kurva mdaħħla fuq l-għajn (ara wkoll it-taqsima ta' hawn taħt fuq effetti stimulatorji). Raġunijiet validi biex ma jintużax metodu statistiku jistgħu jinkludu:

— Id-dejta mhijiex xierqa għal metodi kompjuterizzati biex jipproduċu xi riżultat affidabbli ieħor apparti dawk li jistgħu jinkisbu b'ġudizzju espert — f'tali sitwazzjonijiet xi programmi tal-kompjuter jistgħu anki jonqsu milli jipproduċu soluzzjoni affidabbli (ir-rikorrenzi jaf ma jaqblux, eċċ.)

— Ir-risponsi għal tkabbir stimulatorju ma jistgħux jiġu indirizzati b'mod adegwat permezz tal-programmi tal-kompjuter disponibbli (ara hawn taħt).

Proċeduri statistiċi

54. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analiżi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ppeżata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-dejta dwar ir-rispons — pereżempju f'unitajiet probit jew logit jew Weibull (8), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli ta' dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet bla intoppi. Meta jkunu viċin inibizzjoni żero jew totali, tali irregolaritajiet jistgħu jitkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analiżi (8). Ta' min jinnota li metodi standard ta' analiżi bl-użu ta' trasformati ta' probit, logit jew Weibull huma maħsuba għall-użu f'dejta kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u jridu jiġu mmodifikati biex jakkomodaw id-dejta dwar it-tkabbir jew il-bijomassa. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinstabu f'(9), (10), u (11). L-użu ta' analiżi tar-rigressjoni mhux lineari huwa ddettaljat iktar fl-Appendiċi 5.

55. Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x. Fejn ikun possibbli, għandhom jiġu stmati l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għal kull stima. Kemm toqgħod tajjeb id-dejta dwar ir-rispons għall-mudell ta' rigressjoni għandu jiġi vvalutat grafikament jew statistikament. L-analiżi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament. Jekk, madankollu, ma jkunx faċli li tintuża

▼M6

kurva mhux lineari huwa diffiċli jew ma jirnexxiex minħabba dispersjoni kbira wisq fid-dejta, il-problema tista' tiġi evitata billi ssir ir-rigressjoni fuq il-medji tal-grupp bħala mod prattiku ta' tnaqqis fl-influwenza ta' outliers suspettati. L-użu ta' din l-għażla għandu jiġi identifikat fir-rapport tat-test bħala devjazzjoni mill-proċedura normali peress li l-interpolazzjoni ta' kurva b'repliki individwali ma pproduċietx riżultat tajjeb.

56. Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (13), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibli m'humiex xierqa għad-data.

57. Għal stima tal-LOEC u, għalhekk, l-NOEC, għal effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-rata ta' tkabbir, huwa meħtieġ li jitqabblu l-medji tat-trattament permezz ta' analiżi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Imbagħad il-medja għal kull konċentrazzjoni għandha titqabbel mal-medja tal-kontroll permezz ta' tqabbil multiplu xieraq jew test tat-tendenza. It-test ta' Dunnett jew Williams jista' jkun siewi (12)(14)(15)(16)(17). Huwa meħtieġ li jiġi vvalutat jekk treġġix is-suppożizzjoni tal-omoġeneità ta' varjanza ta' ANOVA. Din il-valutazzjoni tista' titwettaq grafikament jew b'test formali (17). Testijiet xierqa huma Levene jew Bartlett. Jekk is-suppożizzjoni ta' omoġeneità tal-varjanzi ma tkunx issodisfata, din kultant tista' tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, għandha tiġi kkunsidrata analiżi b'metodi bħat-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere. Fi (11) tista' tinstab gwida addizzjonali dwar id-determinazzjoni tal-NOEC.

58. Żviluppi xjentifiċi riċenti wasslu għal rakkomandazzjoni biex jiġi abbandunat il-kunċett tal-NOEC u minflok jinbidel bi stimi EC_x ta' punti bbażati fuq regressjoni. Valur xieraq għal x ma ġiex stabbilit għal dan it-test algali. Sfera ta' 10 sa 20 % tidher li hija xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment kemm l-EC_{10} u EC_{20} għandhom jiġu rrappurtati.

Stimulazzjoni tat-tkabbir

59. Xi drabi hija osservata stimulazzjoni tat-tkabbir (inibizzjoni negattiva) f'konċentrazzjonijiet baxxi. Dan jista' jirriżulta minn ormeżi (“stimulazzjoni tossika”) jew miż-żieda ta' fatturi ta' tkabbir ta' stimulazzjoni bil-materjal tat-test sal-midjum minimu użat. Ta' min jinnota li ż-żieda ta' nutrijenti inorganiċi ma għandu jkollha ebda effett dirett peress li l-midjum tat-test għandu jżomm eċċess ta' nutrijenti matul it-test. Stimulazzjoni f'doża baxxa tista' ġeneralment tiġi injorata f'kalkulazzjonijiet EC_{50} sakemm ma tkunx estrema. Madankollu, jekk hija estrema, jew valur EC_x għal x baxxa għandu jiġi kkalkulat, proċeduri speċjali jistgħu ikunu meħtieġa. Jekk ikun possibbli għandu jiġi evitat tħassir ta' risponsi stimulatorji mill-analiżi tad-dejta, u jekk is-softwer li jadatta l-kurva ma jistax jaċċetta stimulazzjoni minuri, tista' tintuża interpolazzjoni lineari b'bootstrapping. Jekk l-istimulazzjoni tkun estrema, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tal-mudell tal-ormesi (18).

Inibizzjoni tat-tkabbir mhux tossiku

60. Materjali tal-ittestjar li jassorbu d-dawl jistgħu jagħtu lok għal tnaqqis fir-rata ta' tkabbir peress li d-dellijiet inaqqsu l-ammont ta' dawl disponibbli. Tali tipi fiżiċi ta' effetti għandhom jiġu sseparati minn effetti tossiċi billi jiġu mmodifikati l-kundizzjonijiet tat-test u dawn tal-aħħar għandhom jiġu rrapportati b'mod separat. Fi (2) u (3) tista' tinstab gwida.

RAPPORT TAL-ITTESTJAR

61. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

▼**M6**

Sustanza kimika tat-test:

— natura fiżika u proprjetajiet fiżiċi u kimiċi rilevanti, inkluż il-limitu tas-solubbiltà fl-ilma;

— dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (eż. Numru CAS), inkluża l-purità (impuritajiet).

Speċijiet tat-test:

— ir-razza, il-fornitur jew is-sors u l-kundizzjonijiet tal-kulturi użati.

Kundizzjonijiet tat-test:

— id-data tal-bidu tal-ittestjar u d-durata tiegħu;

— deskrizzjoni tad-disinn tal-ittestjar, reċipjenti tat-test, volumi tal-kultura, densità tal-bijomassa fil-bidu tat-test;

— il-komposizzjoni tal-midjum;

— il-konċentrazzjoni tat-test u r-repliki (eż. numru ta' repliki, numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test u l-progress ġeometriku użat);

— deskrizzjoni tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test, inkluż l-użu ta' solventi eċċ.

— apparat tal-kulturi;

— l-intensità u l-kwalità tad-dawl (sors, omoġenità);

— it-temperatura;

— konċentrazzjonijiet ittestjati: il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali u kwalunkwe riżultat tal-analiżijiet biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Għandha tiġi rrapportata l-effiċjenza fl-irkupru tal-metodu u l-limitu tal-kwantifikazzjoni fil-matriċi tal-ittestjar;

— id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-metodu ta' ttestjar;

— il-metodu għad-determinazzjoni tal-bijomassa u l-evidenza tal-korrelazzjoni bejn il-parametru mkejjel u l-piż xott;

Riżultati:

— valuri tal-pH fil-bidu u fi tmiem it-test fit-trattamenti kollha;

— il-bijomassa għal kull flask f'kull punt ta' kejl u l-metodu għall-kejl tal-bijomassa;

— kurvi ta' tkabbir (plott tal-bijomassa mal-ħin);

— il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki;

— preżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-l-konċentrazzjoni u l-effett;

▼M6

— stimi ta' tossiċità varjabbli ta' rispons eż. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} u intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikkalkolati, LOEC u NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— jekk tintuża ANOVA, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. id-differenza l-inqas sinifikanti);

— kwalunkwe stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament;

— kwalunkwe effett ieħor osservat, eż. bidliet morfoloġiċi tal-alga;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

(1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test.

(2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.

(3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

(8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713-718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157-167.

(10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485-1494.

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096-1121

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet li ġejjin jintużaw għall-finijiet ta' dan il-metodu ta' ttestjar:

Il-**bijomassa** hija l-piż xott tal-materja ħajja preżenti f'popolazzjoni espressa f'termini ta' volum partikolari; eż. mg soluzzjoni ta' algi/litri. Ġeneralment il-"bijomassa" hija ddefinita bħala l-massa, iżda f'dan it-test, din il-kelma tintuża biex tirreferi għall-massa skont il-volum. Barra minn hekk f'dan it-test, is-surrogati għall-bijomassa, bħall-għadd taċ-ċelloli, il-fluworexxenza, eċċ. ġeneralment jitkejlu u l-użu tat-terminu "bijomassa" għalhekk jirreferi wkoll għal dawn il-miżuri surrogati.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita

Koeffiċjent ta' varjazzjoni hija miżura mingħajr dimensjoni tal-varjabbiltà ta' parametru, iddefinit bħala l-proporzjon tad-devjazzjoni standard mill-medja. Dan jista' jiġi wkoll espress bħala valur perċentwali. Il-koeffiċjent medju ta' varjazzjoni ta' rata ta' tkabbir speċifika medja fil-kulturi ta' kontroll tar-replikat għandu jiġi kkontrollat kif ġej:

1. Ikkalkola % CV tar-rata ta' tkabbir speċifika medja mir-rati ta' tkabbir kuljum/skont is-sezzjoni għar-replikat rispettiv;

2. Ikkalkola l-valur medju mill-valuri kollha kkalkolati skont il-punt 1 biex tikseb il-koeffiċjenti medju tal-varjazzjoni tar-rata tkabbir ta' kuljum/skont is-sezzjoni fil-kulturi ta' kontroll tar-repliki.

EC_x hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test maħlula fil-midjum tat-test li tirriżulta fi tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir tal-organiżmu tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat (li għandu jissemma b'mod espliċitu jekk ikun hemm devjazzjoni mid-durata tat-test kollu jew normali). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew prodott, is-simbolu "E_rC" huwa użat għar-rata ta' tkabbir u "E_yC" huwa użat għall-prodott.

Midjum ta' tkabbir huwa l-midjum tal-kultura sintetiku komplut li fih tikber l-alga tat-test meta tiġi esposta għas-sustanza kimika tat-test. Normalment is-sustanza kimika tat-test tinħall fil-midjum tat-test.

Rata ta' tkabbir (rata ta' tkabbir speċifika medja) hija ż-żieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu ta' espożizzjoni.

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir (b'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'ħin ta' espożizzjoni partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż ugwali jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżatt taħt l-LOEC.

Il-varjabbli ta' rispons huwa varjabbli għall-istima tat-tossiċità derivata minn parametri mkejla li jiddeskrivu l-bijomassa minn metodi differenti ta' kalkolu. Għal dan il-metodu ta' ttestjar, ir-rati ta' tkabbir u r-rendiment huma varjabbli ta' rispons derivati mill-bijomassa ta' kejl direttament jew kwalunkwe wieħed mis-surrogati msemmija.

▼**M6**

Rata ta' tkabbir speċifika hija varjabbli ta' rispons iddefinit bħala l-kwozjent tad-differenza tal-logaritmi naturali ta' parametru ta' osservazzjoni (f'dan il-metodu ta' ttestjar, il-bijomassa) u l-perjodu ta' żmien rispettiv.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli tal-kejl fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni neqes il-valur tal-varjabbli tal-kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni biex tiġi espressa ż-żieda fil-bijomassa matul it-test.

▼M6

Appendiċi 2

Razez murija li huma xierqa għat-test

Alga ħadra

Pseudokirchneriella subcapitata (li qabel kienet magħrufa bħala *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (li qabel kienet magħrufa bħala *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Dijatomi

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Ċjanobatterji

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sorsi ta' Razez

Ir-razez rakkomandati huma disponibbli f'kulturi unialgali mill-kollezzjonijiet li ġejjin (f'ordni alfabetiku):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nickolausberger Weg 18
37073 Göttingen
GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA.

▼M6

Dehra u karatteristiċi tal-ispeċijiet rakkomandati

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Dehra	Ċelloli uniċi mgħawġin u milwijin	Ċelloli ovali fil-biċċa l-kbira uniċi	Vireg	Ktajjen ta' ċelloli ovali	Vireg
Qies (T × W) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volum ta' ċelloli (µm ([3])/ċellola)	40-60 ([1])	60-80 ([1])	40-50 ([1])	30-40 ([1])	2,5 ([2])
Piż xott taċ-ċelloli (mg/ċellola)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Rata ta' tkabbir ([3]) (jum^{-1})	1,5 -1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

([1]) Imkejla b'kontatur tal-partiċelli elettroniku
([2]) Ikkalkolata mill-qies
([3]) Rata ta' tkabbir osservata l-aktar ta' spiss f'midjum OECD f'intensità ta' dawl ta'madwar 70 µE m^{-2} s^{-1} u 21 °C

Rakkomandazzjonijiet Speċifiċi dwar il-Kulturi u l-Immaniġġar tal-Ispeċijiet tal-Ittestjar Rakkomandati

Pseudokirchneriella subcapitata u Desmodesmus subspicatus

Ġeneralment faċli żżomm dawn l-algi ħodor f'diversi midjums ta' kulturi. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi. Iċ-ċelloli ġeneralment huma solitarji, u l-kejliet tad-densità taċ-ċelloli jistgħu jsiru faċilment permezz ta' kontatur tal-frak elettroniku jew mikroskopju.

Anabaena flos-aquae

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinżamm kultura ewlenija. Huwa partikolarment importanti li jiġi evitat milli l-kultura tal-lott tgħaddi l-fażi ta' tkabbir taz-zokk meta tiġġedded, l-irkupru huwa diffiċli f'dan il-punt.

Anabaena flos-aquae tiżvilupppa aggregati ta' ktajjen ta' ċelloli mbejta. Id-daqs ta' dawn l-aggregati jista' jvarja skont il-kundizzjonijiet tal-kulturi. Jaf ikun meħtieġ li dawn l-aggregati jitqassmu meta l-għadd tal-mikroskopju jew kontatur tal-frak elettroniku jintuża għad-determinazzjoni tal-bijomassa.

Is-sonikazzjoni tas-sottokampjuni tista' tintuża biex jinkisru l-ktajjen biex titnaqqas il-varjabbiltà tal-għadd. Sonikazzjoni itwal milli meħtieġ sabiex jinkisru l-ktajjen f'tulijiet iqsar tista' teqred iċ-ċelloli. L-intensità u d-durata tas-sonikazzjoni għandhom ikunu l-istess għal kull trattament.

Għodd biżżejjed oqsma fuq l-emoċitometru (tal-inqas 400 ċellola) biex tgħin tikkumpensa għall-varjabbiltà. Dan sejjer itejjeb l-affidabbiltà tad-determinazzjonijiet tad-densità mikroskopika.

Jista' jintuża kontatur elettroniku tal-partiċelli għad-determinazzjoni tal-volum ta' ċelloli totali ta' Anabaena wara t-tkissir tal-ktajjen taċ-ċelloli b'sonifikazzjoni b'attenzjoni. L-enerġija ta' sonifikazzjoni għandha tiġi aġġustata biex jiġi evitat it-txifkil taċ-ċelloli.

Uża mikser b'vortiċi jew metodu xieraq simili biex tiżgura li s-sospensjoni tal-alga użata biex tinokula r-reċipjenti tat-test titħallat sew u tkun omoġenja.

▼**M6**

Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitqiegħdu fuq mejda b'mikser orbitali jew reċiprokat b'madwar 150 rivoluzzjoni fil-minuta. Inkella, jistgħu jiġu aġitati b'mod intermittenti biex titnaqqas it-tendenza ta' Anabaena li tifforma ċapep. Jekk ikun hemm ċapep, għandha tingħata attenzjoni biex jintlaħqu kampjuni rappreżentattivi għall-kejliet tal-bijomassa. Jaf tkun hemm bżonn ta' aġitazzjoni qawwija qabel il-kampjunar biex jiġu diżintegrati ċ-ċapep ta' alga.

Synechococcus leopoliensis

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinżamm kultura ewlenija. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi.

Synechococcus leopoliensis tikber bħala ċelloli f'forma ta' vireg solitarji. Iċ-ċelloli huma żgħar ħafna, u dan jikkomplika l-użu ta' għadd mikroskopiku għall-kejliet tal-bijomassa. Kontaturi elettroniċi tal-partiċelli mgħammra għall-għadd ta' partiċelli sa daqs ta' madwar 1 μm huma siewja. Kejliet fluworometriċi in vitro huma applikabbli wkoll.

Navicula pelliculosa

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinżamm kultura ewlenija. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi. Kun af li f'dan il-midjum huwa meħtieġ is-silikat.

Navicula pelliculosa tista' tifforma aggregati f'ċerti kundizzjonijiet ta' tkabbir. Minħabba l-produzzjoni ta' lipidi, iċ-ċelloli algali għandhom it-tendenza li kultant jakkumulaw fir-rita tal-wiċċ. F'ċerti ċirkostanzi jridu jittieħdu miżuri speċjali meta jittieħdu sottokampjuni għad-determinazzjoni tal-bijomassa sabiex jinkisbu kampjuni rappreżentattivi. Jaf ikun meħtieġ tħawwid bis-saħħa, eż. permezz ta' mikser b'vortiċi.

▼**M6**

Appendiċi 3

Idjums tat-tkabbir

Jista' jintuża wieħed miż-żewġ midjums tat-tkabbir li ġejjin:

— Midjum tal-OECD: Midjum oriġinali tat-TG 201 tal-OECD, skont l-ISO 8692 ukoll

— US. AAP tal-midjum tal-EPA, skont l-ASTM ukoll.

Meta jiġu ppreparati dawn il-midjums, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi ta' reaġent jew grad analitiku u ilma dejonizzat.

Kompożizzjonijiet tal-midjum AAP (US. EPA) u l-midjum OECD TG 201.

Komponent	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Il-proporzjon ta' molari ta' EDTA mal-ħadid taqbeż bi ftit l-unità. Dan jevita l-preċipitazzjoni tal-ħadid u fl-istess ħin, il-kelazzjoni ta' jonji tal-metall tqil tiġi minimizzata.

Fit-test bid-dijatomu Navicula pelliculosa, iż-żewġ midja jridu jkunu supplimentati b'$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ sabiex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

Il-pH tal-midjum jinkiseb f'ekwilibriju bejn is-sistema ta' karbonat tas-sistema tal-midjum u l-pressjoni parzjali tas-CO_2 fl-arja atmosferika. Relazzjoni approssimattiva bejn il-pH f'25 °C u l-konċentrazzjoni ta' bikarbonanat molari hija:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

B'15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (midjum tal-EPA tal-Istati Uniti) u b'50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (midjum ta' OECD).

Kompożizzjoni tal-elementi tal-midjums tat-test

Element	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Preparazzjoni tal-midjum OECD

Nutrijent	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija
Soluzzjoni ewlenija 1: makro nutrijenti	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Soluzzjoni ewlenija 2: ħadid	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Soluzzjoni ewlenija 3: elementi tat-traċċi	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Nutrijent	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Soluzzjoni ewlenija 4: bikarbonat	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Sterilizza s-soluzzjoni ewlenija b'filtrazzjoni tal-membrana (dijametru medju tal-pori ta' 0,2 μm) jew b'awtoklavazzjoni (120 °C, 15 min). Aħżen is-soluzzjonijiet fid-dlam f'4 °C.

Tagħmilx awtoklavazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin 2 u 4, iżda sterilizzahom b'filtrazzjoni tal-membrana.

Ipprepara midjum tat-tkabbir billi żżid volum xieraq tas-soluzzjonijiet elwenin 1-4 mal-ilma:

Żid 500 ml ilma sterelizzat:

10 ml soluzzjoni ewlenija 1

1 ml soluzzjoni ewlenija 2

1 ml soluzzjoni ewlenija 3

1 ml soluzzjoni ewlenija 4

Żid sakemm isiru 1 000 ml bl-ilma sterilizzat.

Ħalli biżżejjed ħin biex tekwilibrija l-midjum mas-CO2 atmosferiku, jekk ikun meħtieġ billi ddaħħal bżieżaq tal-arja sterili u ffiltrati għal xi sigħat.

Preparazzjoni tal-midjum EPA tal-Istat Uniti

1. Żid 1 ml ta' kull soluzzjoni ewlenija f'*2.1-2.7* għal madwar 900 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat u mbagħad ħallat sa litru (1).

2. Is-soluzzjonijiet ewlenin tal-makronutrijenti jiġu prodotti billi jinħallu dawn li ġejjin f'500 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat. Ir-reaġenti *2.1, 2.2, 2.3*, u *2.4* jistgħu jiġu kkombinati f'soluzzjoni ewlenija waħda.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2.4	Soluzzjoni Ewlenija tal-Mikronutrijenti (ara 3).	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g.
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Ara n-Nota 1

▼**M6**

Nota 1: Uża għal speċijiet tat-test tad-dijatoma biss. Tista' tiżdied direttament (202,4 mg) jew permezz ta' soluzzjoni ewlenija biex tingħata konċentrazzjoni ta' 20 mg/l Si fil-midjum.

3. Is-soluzzjoni ewlenija tal-mikronutrijenti tiġi prodotta billi jinħallu dawn li ġejjin f'500 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.	
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg.	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg.	
3.5	CoCl2·6H2O	0,714 mg.	
3.6	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg.	[Disodium (Ethylenedinitrilo) tetraacetate].
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg	Ara n-Nota 2.

Nota 2: Uża biss f'midjum għall-kulturi ewlenin tal-ispeċijiet ta' dijatomi.

4. Aġġusta l-pH għal 7,5 ± 0,1 b'0,1 *N* jew 1,0 *N* NaOH jew HCl.

5. Iffiltra l-midjums f'kontenitur sterili jew permezz ta' filtru tal-membrana ta' 0,22 μm jekk ser jintuża kontatur tal-partiċelli jew filtru ta' 0,45 μm jekk mhux ser jintuża kontatur tal-partiċelli.

6. Aħżen il-midjum fid-dlam f'madwar 4 °C sakemm jintuża.

▼M6

Appendiċi 4

Eżempju ta' proċedura għall-kulturi tal-algi

Osservazzjonijiet ġenerali

Il-fini tal-kulturi abbażi tal-proċedura li ġejja huwa li jinkisbu kulturi algali għat-testijiet tat-tossiċità.

Uża metodi xierqa biex tiżgura li l-kulturi algali mhumiex infettati b'batterji. Il-kulturi akseniċi jistgħu jkunu rakkomandabbli iżda għandhom jiġu stabbiliti u użati kulturi unialgali.

L-operazzjonijiet kollha għandhom jitwettqu f'kundizzjonijiet sterili sabiex tiġi evitata kontaminazzjoni b'batterji u algi oħra.

Tagħmir u materjali

Ara taħt il-metodu ta' ttestjar: Apparat.

Proċeduri għall-kisba ta' kulturi algali

Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tan-nutrijenti (midjums):

Il-melħ kollu tan-nutrijenti tal-midjum huwa ppreparat bħala soluzzjonijiet ewlenin ikkonċentrati u maħżuna fid-dlam u l-kesħa. Dawn is-soluzzjonijiet huma sterilizzati b'filtrazzjoni jew b'awtoklavazzjoni.

Il-midjum jitħejja billi jiżdied l-ammont xieraq tas-soluzzjoni ewlenija biex jiġi sterilizzat l-ilma distillat, filwaqt li tingħata attenzjoni li ma sseħħ ebda infezzjoni. Għal midjum solidu, jiżdied 0,8 fil-mija ta' agar.

Kultura ewlenija:

Il-kulturi ewlenin huma kulturi algali li huma ttrasferiti b'mod regolari lejn midjum ġdid biex jaġixxu bħala materjal tat-test inizjali. Jekk il-kulturi ma jintużawx b'mod regolari, dawn jitferrxu f'tubi agari mżerżqa. Dawn huma ttrasferiti lejn midjum ġdid tal-inqas darba kull xahrejn.

Il-kulturi ewlenin jitkabbru fi flasks konikali li fihom l-midjum xieraq (volum ta' madwar 100 ml). Meta l-algi jkunu inkubati f'20 °C b'illuminazzjoni kontinwa, huwa meħtieġ trasferiment kull ġimgħa.

Matul it-trasferiment, ammont ta' kultura "qadima" huwa ttrasferit b'pipetti sterili fi flixkun ta' midjum ġdid, biex b'hekk bl-ispeċijiet li jikbru malajr, il-konċentrazzjoni inizjali hija madwar 100 darba iżgħar mill-kultura l-qadima.

Ir-rata ta' tkabbir ta' speċi tista' tiġi ddeterminata mill-kurva tat-tkabbir. Jekk dan ikun magħruf, huwa possibbli li tiġi stmata d-densità li biha għandha tiġi ttrasferita fil-midjum il-ġdid. Dan għandu jsir qabel ma l-kultura tilħaq il-faża tal-mewt.

Prekultura:

Il-prekultura hija maħsuba biex tagħti ammont ta' algi xierqa għall-inokulazzjoni tal-kulturi tat-test. Il-prekultura hija inkubatur fil-kundizzjonijiet tat-test u użata meta tkun qiegħda tikber b'mod esponenzjali, normalment wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' 2 sa 4 ijiem. Meta l-kulturi algali jkun fihom ċelloli deformati jew anormali, dawn għandhom jiġu skartati.

▼M6

Appendiċi 5

Analiżi tad-dejta skont ir-rigressjoni nonlineari

Kunsiderazzjonijiet ġenerali

Ir-rispons f'testijiet algali u testijiet tat-tkabbir mikrobjali oħra — tkabbir tal-bijomassa — huwa min-natura tiegħu varjabbli kontinwu jew metriku — rata ta' proċess jekk tintuża rata ta' tkabbir u huwa integrali maż-żmien jekk tintgħażel il-bijomassa. It-tnejn huma referenzjati għar-rispons medju korrispondenti tal-kontrolli mhux esposti tar-repliki li juru rispons massimu għall-kundizzjonijiet imposti — b'dawl u temperatura bħala fatturi determinanti prinċipali tat-test algali. Is-sistema hija distribwita jew omoġenja u l-bijomassa tista' tidher bħala kontinwazzjoni mingħajr konsiderazzjoni taċ-ċelloli individwali. Id-distribuzzjoni tal-varjanza tat-tip ta' rispons għal tali sistema hija relatata unikament mal-fatturi sperimentali (ġeneralment deskritti mil-log-normali jew distribuzzjonijiet normali tal-iżball). Dan b'kuntrast għar-risponsi tal-bijomassa tipiċi b'dejta kwantali għal liema t-tolleranza (ġeneralment iddistribwita b'mod binomjali) tal-organiżmi individwali li ħafna drabi huma supponuti li huma komponent tal-varjanza dominanti. Hawnhekk ir-risponsi tal-kontroll huma żero jew fil-livell ta' sfond.

Fis-sitwazzjoni mhux ikkumplikata, ir-rispons normalizzat jew relattiv, r, jonqos monotonikament minn 1 (l-ebda inibizzjoni) sa 0 (inibizzjoni ta' 100 fil-mija). Wieħed għandu jinnota li r-risponsi kollha għandhom żball assoċjat magħhom u li l-inibizzjonijiet negattivi evidenti jistgħu jiġu kkalkolati bħala riżultat ta' żball każwali biss.

Analiżi ta' rigressjoni

Mudelli

Analiżi ta' regressjoni timmira li tiddeskrivi kwantitattivament il-kurva konċentrazzjoni-rispons fil-forma ta' funzjoni matematika regressjoni $Y = f(C)$ jew aktar ta' spiss $F(Z)$ fejn $Z = \log C$. Użata inversament $C = f^{-1}(Y)$ tħalli l-kalkolu tal-figuri EC_x li jinkludi l-EC_{50}, EC_{10} u EC_{20}, u l-95 % tagħhom ta' limiti ta' kunfidenza. Diversi forom matematiċi funzjonali sempliċi taw prova li jiddeskrivu b'suċċess ir-relazzjonijiet bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons miksuba fit-testijiet tal' inibizzjoni tat-tkabbir tal-alga. Il-funzjonijiet jinkludu eż. l-ekwazzjoni loġistika, l-ekwazzjoni asimettrika ta' Weibull u l-funzjoni tad-distribuzzjoni normali tal-log, li huma kollha kurvi ta' sigmoid li asimptotikalment joqorbu lejn iż-żero għal $C \rightarrow 0$ u waħda għall-infinit ta' $C \rightarrow$.

L-użu tal-mudelli tal-funzjoni tal-livell limitu kontinwu (eż. il-mudell ta' Kooijman "għall-inibizzjoni tat-tkabbir tal-popolazzjoni" Kooijman et al. 1996) ġie propost dan l-aħħar jew alternattiv għall-mudelli asintotiċi. Dan il-mudell jassumi xejn effetti f'konċentrazzjonijiet taħt ċertu livell, EC_0+, li huwa stmat permezz ta' estrapolazzjoni tar-relazzjoni rispons-konċentrazzjoni biex tinterċetta l-bażi ta' konċentrazzjoni permezz tal-użu ta' funzjoni kontinwa li ma hijiex differenzjabbli fil-punt tat-tluq.

Kun af li l-analiżi tista' tkun sempliċi minimizzazzjoni tas-somom tal-kwadri residwi (jekk tiġi supponuta varjanza kostanti) jew kwadri ppeżati jekk l-eteroġenità tal-varjanza tiġi kkumpensata.

Proċedura

Il-proċedura tista' tiġi deskritta kif ġej: Agħżel ekwazzjoni funzjonali xierqa, $Y = f(C)$, u adattaha għad-dejta permezz ta' rigressjoni nonlineari. Idealment għandek tuża l-kejliet minn kull flask individwali iktar milli l-medji tar-repliki, sabiex testratta kemm jista' jkun informazzjoni mid-dejta. Jekk il-varjanza tkun għolja,

▼**M6**

min-naħa l-oħra, l-esperjenza prattika tissuġġerixxi li l-medji tar-repliki jistgħu jipprovdu stima matematika iktar robusta li hija inqas influwenzata minn żbalji sistematiċi fid-dejta, milli b'kull punt ta' dejta individwali miżmum.

Ipplottja l-kurva mdaħħla u d-dejta mkejla u eżamina jekk il-kurva mdaħħla hijiex xierqa. Analiżi tar-residwi tista' tkun għodda partikolarment utli għal dan il-għan. Jekk ir-relazzjoni funzjonali magħżula biex jiddaħħal ir-rispons tal-konċentrazzjoni ma tiddeskrivix sew il-kurva kollha jew xi parti essenzjali tagħha, bħar-rispons f'konċentrazzjonijiet baxxi, agħżel opzjoni ta' dħul tal-kurva oħra — eż. kurva mhux asimettrika bħall-funzjoni ta' Weibul minflok waħda simettrika. L-inibizzjonijiet negattivi jistgħu jkunu problema, pereżempju bil-funzjoni tad-distribuzzjoni normali tal-log li bl-istess mod titlob funzjoni tar-rigressjoni alternattiva. Mhuwiex rakkomandat li tassenja valur żero jew pożittiv żgħir għal tali valuri negattivi peress li dan ifixkel id-distribuzzjoni tal-iżball. Jista' jkun adegwat li jsir dħul ta' kurvi separati fuq partijiet tal-kurva bħall-parti ta' inibizzjoni baxxa sabiex jiġu stmati figuri $EC_{lowx.}$ Ikkalkula mill-ekwazjoni mdaħħla (permezz ta' "estimazzjoni inversa", $C = f^{-1}(Y)$), stimi karatteristiċi ta' punt EC_x's,u rraporta bħala minimu l-EC_{50} u wieħed jew żewġ stimi $EC_{low\ x}$. L-esperjenza mill-ittestjar prattiku wriet li l-preċiżjoni tat-test algali normalment tippermetti stima raġonevolment preċiża fil-livell tal-inibizzjoni ta' 10 % jekk il-punti ta' dejta jkunu suffiċjenti — sakemm ikun hemm stimulazzjoni f'konċentrazzjonijiet baxxa bħala fattur ta' konfużjoni. Il-preċiżjoni ta' stima EC_{20} hija ta' spiss konsiderevolment aħjar minn dik ta' EC_{10}, għaliex l-EC_{20} huwa ġeneralment ippożizzjonat fuq il-parti bejn wieħed u ieħor lineari tal-kurva ċentrali konċentrazzjoni rispons. Xi drabi huwa diffiċli li ssir interpretazzjoni ta' EC_{10} minħabba stimulazzjoni ta' tkabbir. Għalhekk, filwaqt li l-EC_{10} hija normalment miksuba b'akkurezza suffiċjenti, huwa wkoll rakkomandat li tirraporta dejjem l-EC_{20}.

Fatturi ta' ppeżar

Il-varjanza sperimentali, ġeneralment mhijiex konsistenti u ġeneralment tinkludi komponenti proporzjonali, u għalhekk normalment titwettaq rigressjoni ppeżata b'mod vantaġġjuż. Il-fatturi ta' ppeżar għal tali analiżi, normalment huma preżunti bħala proporzjonalment inversi għall-varjanza:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Ħafna programmi ta' rigressjoni jippermettu l-opzjoni ta' analiżi ta' rigressjoni ppeżata b'fatturi ta' ponderazzjoni elenkati f'tabella. B'mod konvenjenti l-fatturi ta' ppeżar għandhom jiġu normalizzati billi dawn jiġu mmoltiplikati b'$n/\Sigma\ w_i$ (n huwa n-numru ta' punti ta' dejta) biex b'hekk it-total tagħhom ikun wieħed.

Risponsi normalizzanti

In-normalizzazzjoni permezz tar-rispons ta' kontroll medju twassal għal xi problemi ewlenin u tagħti lok għal struttura ta' varjanza pjuttost ikkumplikata. Meta wieħed jaqsam ir-risponsi bir-rispons ta' kontroll medju għall-kisba tal-perċentwal ta' inibizzjoni, jintroduċi żball addizzjonali kkawżat mill-iżball fil-medja tal-kontroll. Sakemm dan l-iżball ma jkunx negliġibbilment żgħir, il-fatturi ta' ppeżar fil-limiti ta' rigressjoni u kunfidenza għandhom jiġu korretti għall-kovarjanza mal-kontroll (Draper u Smith, 1981). Kun af li l-preċiżjoni għolja fuq ir-rispons ta' kontroll medju stmat huwa importanti sabiex titnaqqas il-varjanza globali għar-rispons relattiv. Din il-varjanza hija kif ġej:

(Is-sottoskritt i jirreferi għal-livell ta' konċentrazzjoni u s-sottoskritt 0 għall-kontrolli)

$$Yi = \text{Rispons relattiv} = ri/r0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼M6

bil-varjanza $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi\ /\ \partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/\ \partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

u għax $(\partial Y_i/\ \partial r_i) = 1/r_0$ u $(\partial Y_i/\ \partial r_0) = r_i/r_0^2$

b'dejta normalment distribwita u m_i u m_0 repliki: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

il-varjanza totali tar-rispons relattiva, Y_i għalhekk issir:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

L-iżball fil-medja tal-kontroll huwa proporzjonat b'mod invers għall-għerq kwadrat tan-numru tar-repliki tal-kontroll bħala medja, u xi drabi jista' jkun iġġustifikat biex jinkludi dejta storika u b'dan il-mod inaqqas bil-qawwi l-iżball. Proċedura alternattiva mhijiex dik li tiġi nnormalizzata d-dejta u jitqiegħdu risponsi assoluti inkluża d-dejta tar-rispons ta' kontroll iżda li jiġi introdott valur tar-rispons ta' kontroll bħala parametru addizzjonali li għandu jiddaħħal b'rigressjoni nonlineari. B'ekwazzjoni tar-rigressjoni b'2 parametri tas-soltu, dan il-metodu jeħtieġ li jiddaħħlu 3 parametri u, għalhekk, jirrekjedi iktar punti ta' dejta minn rigressjoni nonlineari fuq id-dejta li hi normalizzata permezz ta' rispons predeterminat ta' kontroll.

Intervalli ta' kunfidenza inversi

Il-kalkolu tal-intervalli ta' kunfidenza tar-rigressjoni mhux lineari minn stima inversa huwa pjuttost kumpless u mhux opzjoni standard disponibbi f'pakketti ta' programmi statistiċi tal-kompjuter ordinarji. Limiti ta' kunfidenza approssimattivi jistgħu jiġu miksuba ma' programmi standard ta' regressjoni non-lineari ma' riparametrizzazzjoni (Bruce u Versteeg, 1992), li jinvolvu l-kitba mill-ġdid tal-ekwazjoni matematika bil-punti ta' stima mixtieqa, eż. l-EC_{10} u l-EC_{50} bħala parametri li għandhom jiġu stmati. (Ħalli l-funzjoni tkun I = f (α, β, Konċentrazzjoni) u uża r-relazzjonijiet tad-definizzjoni f (α, β, EC_{10}) = 0,1 u f (α, β, EC_{50}) = 0,5 għas-sostitut f (α, β, konċentrazzjoni) b'funzjoni ekwivalenti g(EC_{10}, EC_{50}, konċentrazzjoni).

Kalkulazzjoni aktar diretta (Andersen et al, 1998) hija magħmula permezz taż-żamma tal-ekwazjoni oriġinali u l-użu ta' espansjoni ta' Taylor madwar il-medji ta' r_i u r_0.

Dan l-aħħar il-"metodi boot strap" saru popolari. Tali metodi jużaw id-dejta mkejla u kampjunar mill-ġdid frekwenti mmexxi minn ġeneratur tan-numri każwali biex tiġi stmata d-distribuzzjoni tal-varjanza empirika.

REFERENZI

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R..D. and Versteeg,, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

C.4. DETERMINAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ "LESTA"

PARTI I. KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI

I.1. INTRODUZZJONI

Sitt metodi tat-ġtestijiet huma deskritti li jippermettu l-għażla tal-kimiċi għal biodegradabbilità lesta f; medja akwea arobika:

(a) Karbonju Organiku Mdewweb (DOC) Bit-Tneħħija tal-Kulur (Metodu °C.4-A)

(b) Għażla Modifikata OECD – DOC Bit-Tneħħija tal-Kulur (Metodu °C.4-B)

(ċ) Evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju (CO_2) (Test Sturm modifikat (Metodu °C.4-C)

(d) Respirometrija Manjometrika (Metodu °C.4-D)

(e) Flixkun magħluq (Metodu °C.4-E)

(f) MITI (Ministeru tal-Kummerċ Internazzjonali u l-Industrija – Ġappun) (Metodu °C.4-F)

Konsiderazzjonijiet ġenerali u komuni għas-sitt testijiet kollha huma mogħtija fil-Parti I tal-metodu. Punti speċifiċi għal metodi individwali huma mogħtija fil-Partijiet II sa VII. L-annessi fihom definizzjonijiet, formuli u materjal ta' gwida.

Eżerċizzju ta' tqabbil inter-laboratorju OECD, magħmul fil-1988, kien wera li l-metodi jagħtu riżultati konsistenti. B'danakollu, jiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi tal-sustanza tat-test, wieħed jew ieħor mill-metodi jista jkun preferut.

I.2. SELEZZJONI TAL-METODU XIERAQ

Sabiex ikun magħżul il-metodu l-aktar xieraq, informazzjoni dwar is-solubbiltà tal-kimika, pressa tal-fwar u l-karatteristiċi ta' l-assorbazzjoni huma essenzali. L-istruttura jew il-formula tal-kimika għandhom ikunu magħrufa sabiex ikun ikkalkolati l-valuri teoretiċi u/jew il-verifika tal-valuri mkejla tal-parametri, eż. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (ara l-Annessi I u II).

Kimiki tat-test li jinħallu fl-ilma għal mill-anqas 100 mg/l jistgħu ikunu assessjati bil-metodi kollha, basta li dawn ma jkunux volatili u mhux-assorbanti. Għal dawk il-kimiki li jinħallu bilmod fl-ilma, li huma volatili jew assorbanti, metodi xierqa huma indikati fit-Tabella 1. Il-manjera li biha l-kimiċi li jinħallu bilmod fl-ilma u kimiki volatili jistgħu ikunu ittratti kif deskritt fl-Anness III. Kimiki moderatament volatili jistgħu ikunu ittestjati bil-metodu DOC tat-Tneħħija tal-Kulur jekk ikun hemm spazzju biż-żejjed tal-gass fir-reċipjenti tat-test (li għandhom ikunu magħluqa sewwa). F'dan il-każ, kontrol abjotiku jista jkun stabbilit sabiex jippermetti għal xi telf fiżiku.

▼B

Tabella 1

Applikabbiltà tal-metodi tat-test

Test	Metodu analitiku	Adattabbilità għal taħlitiet li huma:		
		Jinħallu ftit	volatili	assorbenti
DOC Tneħħija tal-kulur	Karbonju organiku mdewweb	—	—	+/–
Mod. OECD Tneħħija tal-kulur	Karbonju organiku mdewweb	—	—	+/–
Evoluzzjoni CO_2	Respirometrija: Evoluzzjoni CO_2	+	—	+
Respirometrija manometrika	Respirometrija manometrika: konsum ta' l-ossiġenu	+	+/–	+
Flixkun magħluq	Respirometrija: ossiġenu mdewweb	+/–	+	+
MITI	Respirometrija: konsum ta' l-ossiġenu	+	+/–	+

Informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet relattivi ta' komponenti maġġuri tal-materjal tat-test hija meħtieġa għall-interpretazzjoni tar-riżultati akkwistati, speċjalment meta r-riżultati huma baxxi jew marġinali.

Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika tat-test mal-bakterja (l-Anness IV) tista tkun ferm utili għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista tkun essenzjali għall-interpretazzjoni tajba tal-valuri tal-biodegradazzjoni baxxa.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sabiex tkun verifikata l-proċedura, kimiċi ta' referenza li jilħqu l-kriterja għal biodegradabbilità faċli huma ittestjati billi jkun hemm garafina xierqa b'mod parallel mal-provi nomali tat-test.

Kimiċi xierqa huma l-anilin (iddistillat frisk), l-aċetat tas-sodju u l-benżoat tas-sodju. Dawn il-kimiċi ta' referenza kollhom jkollhom degradazzjoni b'dawn il-metodi meta l-ebda inoculum ma jkun deliberatament miżjud.

Huwa suġġerit li kika ta' referenza għandha tkun imfittxija li jkollha biodegradabbilità faċli imma meħtieġa b'żieda ma l-inoculum. Il-ftalat ta' l-idroġenu tal-putassa kien proponut imma aktar evidenza jeħtieġ li tkun akkwistata b'din is-sustanza qabel ma tista tkun aċċettata bħal sustanza ta' referenza.

Fit-testijiet respirometriċi, il-komposti li jkun fihom in-nitroġenu jistgħu jaffettwaw l-akkwist ta' l-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni (ara l-Annessi II u V).

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI TAT-TEST

Taħlita, jew sospenzjoni, tas-sustanza tat-test f'medja minerali, hija innokulata u inkubata permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, fid-dlam jew f'dawl baxx hafna. L-ammont ta' DOC fit-taħlita tat-test minħabba l-inoculum għandu jinżamm baxx kemm jista jkun possibbli imqabbel ma l-ammont ta' DOC minħabba s-sustanza tat-test. Għandu jkun hemm marġini għall-attività endoġenea ta' l-inoculum billi jkunu mwettqa testijiet parallelli fl-imbjank bl-inoculum imma mingħajr is-sustanza tat-test, għalkemm l-attività endoġenea taċ-ċelloli fil-preżenta tas-sustanza ma tkunx eżattament taqbel ma dik fil-kontroll endoġeneu. Sustanza ta' referenza tkun utilizzata b'mod parallel għall-verifika ta' l-operazzjoni tal-proċeduri.

▼B

Ġeneralment, degradazzjoni hija segwita bid-determinazzjoni tal-parametri, bħalma huma DOC, produzzjoni CO_2 bl-akkwist ta' l-ossiġenu, u l-kejl ikun meħud f'intervalli ta' spiss suffiċjenti sabiex jippermettu l-identifikazzjoni tal-bidu u tat-tmiem tal-biodegradazzjoni. B'respirometri awtomatiċi, il-kejl ikun kontinwu. DOC ta' kultant huwa mkejjel b'żieda ma parametru ieħor, imma dan normalment iseħħ biss fil-bidu u fit-tmiem tat-test. Analiżi kimika speċifika tista wkoll tkun użata għall-assessjar tad-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test, u sabiex tkun determinata l-konċentrazzjoni ta' xi sustanzi intermedji iffurmati (obligatorja fit-test MITI).

Normalment, it-test idum 28 jum. B'danakollu, t-testijiet jistgħu jieqfu qabel it-28 jum, i.e. malli l-kurva tal-bijodegredazzjoni tkun laħqet il-quċċata lixxa għal mill-anqas 3 determinazzjonijiet. It-testijiet jistgħu wkoll ikunu mtawla lill hinn minn 28 jum meta l-kurva turi li l-biodegradazzjoni tkun bdiet imma l-quċċata lixxa ma tkunx intlaħqet fil-jum 28.

I.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

1.5.1. **Reproduċibbiltà**

Minħabba n-natura tal-biodegradazzjoni u tal-popolazzjoni mħallta tal-bakterja użata bħala inocula, determinazzjonijiet għandhom jitwettqu mill-anqas b'mod doppju.

Hija esperjenza komuni li akbar ma tkun il-konċentrazzjoni tal-mikro-organiżmi inizjalment miżjuda mal-medja tat-test, aktar tkun żgħira l-varjazzjoni bejn ir-repetizzjonijiet. Testijiet biċ-ċrieki kienu wkoll urew li kien hemm varjazzjonijiet kbar bejn ir-riżultati akkwistati minn laboratorji differenti, imma ftehim tajjeb huwa normalment akkwistat b'komposti faċilment biodegradabbli.

1.5.2. **Validità tat-test**

Test huwa meqjus bħala validu jekk id-differenza ta' l-estremi fil-valuri tar-repetizzjoni tat-tneħħija tal-kimika tat-test fil-quċċata lixxa, fit-tmiem tat-test jew fit-tmiem tas-sessjoni ta' 10 ijiem, kif xieraq, hija anqas minn 20 % u jekk il-perċentwal tad-degradazzjoni tas-sustanza ta' referenza jkun laħaq il-livell għal biodegradabbiltà faċli sa 14-il jum. Jekk waħda minn dawk il-kondizzjonijiet ma tkunx milħuqha, it-test għandu jkun repetut. Minħabba l-limitazzjoni stretta tal-metodi, valuri baxxi mhux neċessarjament ifissru li s-sustanza tat-test ma tkun biodegradabbli permezz tal-kondizzjonijiet ambjentali, imma tindika li aktar xogħol għandu jsir sabiex tkun stabbilita l-biodegradabbiltà.

Fit-test tat-tossiċità, li jkun fih kemm it-test tas-sustanza u kimika ta' referenza, anqas minn 35 % degradazzjoni (ibbażat fuq DOC) jew anqas minn 25 % (ibbażata fuq ThOD jew $ThCO_2$) li tkun seħħet matul l-14-il jum, il-kimika tat-test tista tkun meqjusa bħala inibitriċi (ara wkoll l-Anness IV). Is-serje ta' testijiet għandu jkun repetut, jekk possibbli bl-użu ta' konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test u/jew ta' konċentrazzjoni aktar għolja ta' l-inoculum, imma mhux aktar minn 30 mg solidi/litru.

I.6. PROCEDURA ĠENERALI UPREPARAZZJONIJIET

Il-kondizzjonijiet ġenerali applikabbli għat-testijiet huma riassunti fit-Tabella 2. Apparat u l-kondizzjonijiet sperimentali tal-kondizzjonijiet li jappartieni speċifikament għal test individwali huma deskritti aktar tard taħi l-intestatura għall-dak it-test.

▼B

Tabella 2

Kundizzjonijiet tat-test

Test	DOC Tneħħija tal-kulur	Evoluzzjoni CO_2	Respirometrija manometrika	Għażla modifikati	Flixkun magħluq OECD	MITI (1)
Konċentrazzjoni tas-Sustanza tat-test hija bħ						
ala mg/l			100		2-10	100
mg DOC/l	10-40	10-20	10-40			
mg ThOD/l			50-100		5-10	
Konċentrazzjoni ta' l-Inoculum (f'ċelloli/I, b'mod approssimattiv)	≤ 30 mg/1 SS jew ≤ 100 ml effluwent/1 (10^7- 10^8)			0,5 ml affluwent sekondarju/l (10^5)	≤ 5 ml ta' l-effluwent/1 (10^4 - 10^6)	30 mg/l SS (10^7 - 10^8)
Konċentrazzjoni ta' l-elementi fil-medja minerali (fi mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					preferibbilment 7,0
Temperatura	22 ± 2 °C					25 + 1 °C

DOC = Dissolved Organic Carbon (Karbonju organiku mdewweb)

ThOD = Theoretical Oxygen Demand (Talba teoretika ta' l-ossiġenu)

SS = Solidi sospiżi

I.6.1. **Ilma tat-trattib**

Ilma deonizzat jew distillat, ħieles minn konċentrazzjonijiet inibitorji ta' sustanzi tossiċi (eż. Cu^{++} jonji) huwa wżat. Dan għandu jkun fih mhux aktar minn 10 % tal-kontenut tal-karbonju organiku introdott bil-materjal tat-test. Il-purità għolja ta' l-ilma tat-test hija meħtiega sabiex telimina l-valuri għolja fl-imbjank. Kontaminazzjoni tista tirriżulta minn impuritajiet inerenti u wkoll minn reżini ta' l-iskambju tal-jonji u l-materjal lysed mill-bakterja u l-algae. Għal kull serje ta' testijiet għandek tuża lott wieħed biss ta' ilma, ivverifikat bil-quddiem bl-analiżi DOC. Tali verifika ma tkunx meħtieġa għat-test tal-flixkun magħluq, imma l-konsum ta' l-ossiġenu ta' l-ilma għandu jkun baxx.

▼B

I.6.2. **Taħlitiet bil-lest ta' komposti minerali**

Sabiex isiru t-taħlitiet tat-test, taħlitiet bil-lest tal-konċentrazzjonijiet xierqa jkunu magħmula minn komponenti minerali. Dawn it-taħlitiet bil-lest li ġejjin jistgħu jkunu wżati (bil-fatturi differenti tat-trattib) għall-metodu DOC Tneħħija bil-kulur, Għażla OECD Modifikata, Evoluzzjoni CO_2, Respirometrija Manometrika, it-test tal-Flixkun Magħluq.

Il-fatturi tat-trattib u, għat-test MITI, il-preparazzjoni speċifika tal-medja minerali, huma mogħtija taht l-intestaturi tat-testijiet speċifiċi.

Taħlitiet bil-lest:

Ipprepara t-taħlitiet bil-lest li ġejjin, bl-użu ta' reaġenti ta' grad analitiku.

a	Monopotassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4	8,50 g
	Dipotassium monohydrogen orthophosphate, K_2HPO_4 Disodium	21,75 g
	monohydrogen orthophosphate dihydrate Na_2HPO_4. 2 H_2O Klorid	33,40 g
	ta' l-ammonium NH_4Cl	0,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal sa 1 litru. Il-pH tat-taħlita għandu jkun 7,4.	
b	Klorid tal-kalċji, anidriju, $CaCl_2$	27,50 g
	jew dihidrat tal-klorid tal-kalċju $CaCl_2$, 2 H_2O	36,40 g
	Dewweb fl-ilma u wassal sa litru	
c	Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $MgSO_4$. 7 H_2O	22,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru	
d	Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, $FeC1_3$. $6H_2O$	0,25 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	

Nota: Sabiex tkun evitata l-ħtieġa li tkun ippreparata din is-soluzzjonu immedjetament qabel l-użu, żid qatra ta' HCL ikkonċentrat, jew 0,4 g melħ disodju ta' l-aċidu ethylenediaminetetraaċetiku (EDTA) kull litru.

I.6.3. **Taħlitiet bil-lest ta' kimiċi**

Per eżempju, dewweb 1-10 g, kif xieraq, tal-kimika tat-test jew ta' referenza, f'ilma de-jonizzata u wassal sa litru meta s-solubbiltà teċċedi 1 g/l. Altrimenti, ipprepara t-taħlitiet bil-lest fil-medja minerali jew żid il-kimika direttament mal-medja minerali. Għat-trattament ta' kimiċi anqas solubbli, ara l-Anness III, imma fit-test MITI (il-Metodu °C.4-F), la s-solventi u l-anqas l-aġenti emulsifikanti m'għandhom ikunu wżati.

▼B

1.6.4. **Inocula**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: ħama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u ħamrija jew minn taħlita ta' dawn. Għal testijiet tar-Repirometrija ta' l-Evoluzzjoni jew Manjometika DOC Tneħħija bil-Kulur, CO_2, jekk il-ħama' attivata tkun użata, dan għandu jkun meħud minn impjant tat-trattament jew unità ta' skala ta' laboratorju li tirċieci predominantament drenaġġ domestiku. Kien instab li Inocula minn sorsi oħrajn tagħti tixrid aktar għoli tar-riżultati. Għall-għażla OECD Modifikata u t-testijiet tal-Flixkun Magħluq, inoculum mingħajr il-frak tal-ħama' aktar imdewwb huwa meħtieġ u s-sorsi preferita huwa l-effluwent sekondarju mill-impjant tat-trattament ta' l-ilma ta' l-iskart domestiku jew minn unita ta' skala ta' laboratorju. Għat-test MITI, l-inoculum huwa akkwistat minn taħlita ta' sorsi u huwa deskritt taħt l-intestatura ta' dan it-test speċifiku.

I.6.4.1. *Inoculum minn ħama' attivita*

Iġbor kampjun minn ħama' attivata friska mit-tank ta' l-arjazzjoni ta' l-impjant tat-trattament tad-drenaġġ jew minn unit'ta' skala tal-laboratorju li predominantament jitratta d-drenaġġ domestiku. Warral il-partiċelli rozzi, jekk meħtieġ bil-filtrazzjoni minn passatur fin u wara dan zomm il-ħama f'mod erobiku.

B'mod alternattiv, ħalli joqgħod, jew inkella għaddi miċ-ċentrufuga (eż. fi l 100 g għal 10 min.) wara t-tneħħija ta' xi partiċelli rozzi. Warrab is-supernatant. Il-ħama tista tkun maħsula f'medja minerali. Issospendi l-ħama ikkonċentrata f'medja minerali sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' 3-5 g solidi sospiżi kull litru u imla bl-arja sakemm meħtieġ.

Il-ħama' għandha tkun miġbura proporzjonalment minn impjant ta' xogħol konvenzjonali. Jekk il-ħama jkun jeħtieġ li tinġabar minn impjant ta' trattament qawwi, jew ikun maħsub li jkun fiha inibituri, din għandha tkun maħsula. Ħalliha toqgħod jew għaddi l-ħama' sospiża mill-ġdid minn ċentrifugu wara li tkun imħallta sewwa, warrab is-supernatant u mill-ġdid erġa issospendi l-ħama' maħsula f'volum ieħor tal-medja minerali. Irrepeti din il-proċedura sakemm il-ħama' tkun meqjusa bħala ħielsa minn substrata jew inibitur eċċessivi.

Wara li s-sopenzjoni sħiħa mill-ġdid tkun akkwistata, jew b'ħama' mhux trattata, warrab il-pamkun immedjetament qabel l-użu għad-determinazzjoni tal-piż xott tas-solidi sospiżi.

Alternattiva oħra hija li tkun omoġenizzata l-ħama' attivata (3-5 g solidi sospiżi kull litru). Il-ħama' hija trattata f'ħawwadi mekkaniku għal 2 minuti f'veloċità medja. Ħalli l-ħama' tal-ħawwadi toqgħod għal 30 minuta jew aktar jekk hekk meħtieġ u ferra l-likwidu għall-użu bħala inoculum bir-rata ta' 10 ml/l tal-medja minerali.

I.6.4.2. *Sorsi oħrajn ta' l-inoculum*

Dan jista jkun akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Iġbor kampjun frisk u żommu erobiku waqt it-trasport. Ħallieh joqgħod għal siegħa jew iffiltra minn karta rozza tal-filtru u żomm l-effluwent imferra jew il-filtrat erobiku sakemm ikunu meħtieġa. Sa 100 ml ta' dan it-tip ta' inoculum jista jkun użat ma kull litru ta' medja.

▼B

Sors ieħor għall-inoculum hija l-ilma tal-wiċċ ta' l-art. F'dan il-każ, iġbor kampjun xieraq mill-ilma tal-wiċċ, eż. xmara, għadira, u żommu erobiku sakemm ikun meħtieġ. Jekk meħtieġ, ikkonċentra l-inoculum bil-fitrazzjoni jew biċ-ċentrifugazzjoni.

1.6.5. **Pre-kondizzjonat ta' l-inocula**

L-inocula tista tkun pre-kondizzjonata għall-kondizzjonijiet sperimentali,, imma mhux pre-afattata għall-kimika tat-test. Il-pre-kondizzonjar jikkonsisti mill-arjazzjoni tal-ħama' attvita f'medja minerali jew effluwent sekondarju għal 5-7 tijiem fit-temperatura tat-test. Il-pre-kondizzjonar ta' kull tant itejjeb il-prċiżjoni tal-metodi tat-test bit-tnaqqis tal-valuri vojta. Huma meqjus bħala mhux neċessarju il-pre-kondizzjonar ta' l-inoculum MITI.

1.6.6. **Kontrolli abjotiċi**

Meta meħtieġ, għandek tivverifika d-degradazzjoni abjotika possibbli tas-sustanza tat-test bid-determinazzjoni tat-tneħħija ta' DOC, l-akkwist ta' l-ossiġenu jew ta' l-evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju f'kontrolli sterili li ma jkun fihom l-ebda inoculum. Sterlizza bil-filtrazzjoni minn membrana (0,2 - 0,45 mikrometri) jew biż-żieda ta' sustanza tossika xierqa fil-konċentrazzjoni adatta. Jekk tkun użata l-membrana tal-filtrazzjoni, iġbor kampjuni b'mod axettiku għaż-żamma tal-isterilità. Sakemm l-assorbazzjoni tal-kimika tat-test ma tkunx diġa ġiet imwarrba minn qabel, testijiet li jkejlu l-biodegradazzjoni bħala t-tneħħija ta' DOC, speċjalment bl-inocula tal-ħama' attivita, għandhom jinkludu kontroll abjotiku li huwa innokulat u ivvelenat.

I.6.7. **Numru ta' garafini**

In-numru ta' garafini fi prova tipika huwa deskritt taħt l-intestaturi ta' kull wieħed mit-testijiet.

It-tip ta' garafina li ġej jista jkun użat:

— Sospenzjoni tat-test: li jkun fiha s-sustanza tat-test u l-inoculum

— Inoculumi fl-imbjank: li jkun fih biss l-inoculum

— Proċedura tal-kontroll: li jkun fiha s-sustanza ta' referenza u l-inoculum

— Kontroll ta' abjotiku sterili: sterili, li jkun fiha s-sustana tat-test (ara I.6.6)

— Kontroll ta' l-adsorbazzjoni: li jkun fiha s-sustanza, l-inoculum u l-aġent sterilizzanti

— Kontroll tat-tossiċità: li jkun fiha s-sustanza tat-test, is-sustanza ta' referenza u l-inoculum

Huwa mandatorju li d-determinazzjoni tas-sospenzjoni tat-test u l-imbjank ta' l-inoculum iseħħ b'mod paralell. Huwa rakommandabbli li jsiru d-determinazzjonijiet fil-garafini l-oħrajn b'mod parallel ukoll.

Dan jista, b'danakollu, mhux dejjem ikun possibbli. Assigura li kampjoni jew qari suffiċjenti jkunu meħuda sabiex jippermettu t-tneħħija perċentwali fl-ispażju ta' l-10 ijiem ta' l-assessjar.

▼B

I.7. DATA U EVALWAZZJONI

Fil-kalkolu ta' D_t, id-degradazzjoni preċentwali, il-valuri medji tal-kejl duplikat tal-parametru fiż-żewġ reċipjenti tat-test u l-imbjank ta' l-inoculum, ikunu wżati. Dawn il-formuli huma stabbiliti fis-sezzjonijiet ta' hawn taħt fit-testijiet speċifiċi. Il-korsa tad-degradazzjoni hija murija b'mod grafiku u l-perijodu ta' 10 ijiem huwa indikat. Ikkalkola u irrapporta l-perċentwal tat-tneħħija milħuq fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-valur tal-quċċata lixxa jew fit-tmiem tat-test, liema minnhom huwa xieraq.

Fit-testijiet respirometriċi, l-komposti li jkun fihom in-nitroġenu jistgħu jaffettwaw l-akkwist ta' l-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni (ara l-Annessi II u V).

I.7.1. **Degradazzjoni mkjela permezz tad-determinazzjoni DOC**

Id-degredazzjoni perċentwali D_t kull darba li kampjun ikun miġbur għandha tkun ikkalkolata b'mod separat għal kull waħda mill-garafini li jkun fihom is-sustanza tat-test bl-użu tal-valuri medji tal-kejn duplikat DOC sabiex il-validità tat-test tista tkun assessjata (ara I.5.2.). Hija ikkalkolata bl-użu ta' din l-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

meta:

D_t = % degradazzjoni fil-ħin t,

C_o = il-medja tal-bidu tal-konċentrazzjoni ta' DOC tal-kultura inokulata fil-medju li jkun fih is-sustanza tat-test (mg DOC/l),

C_t = il-medja tal-konċentrazzjoni ta' DOC tal-kultura innokulata fil-medju li jkun fih is-sustanza fil-ħin t (mg DOC/l),

C_{bo} = il-medja tal-bidu tal-konċentrazzjonini ta' DOC fl-imbjank inokulata fil-medja minerali (mg DOC/l),

C_{bt} = il-medja tal-konċentrazzjoni ta' DOC fl-imbjank innokulata fil-medja minerali fil-ħin t (mg DOC/l),

Il-konċentrazzjoninijiet kollha huma mkejla b'mod sperimentali.

I.7.2. **Degradazzjoni mkjela permezz ta' analiżi speċifika**

Meta data analitika speċifika tkun disponibbli, wettaq il-kalkolazzjoni tal-biodegredazzjoni primarja minn:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

meta:

D_t = % degradazzjoni fil-ħin t, normalment 28 jum,

S_a = ammont residwu tas-sustanza tat-test fil-medja inokulata fit-tmiem tat-test (mg),

S_b = l-ammont residwu tas-sustanza tat-test fit-test fl-imbjank bl-ima/medja li magħha tkun ġiet miżjuda biss is-sustanza tat-test (mg).

▼B

I.7.3. **Degredazzjoni abjotika**

Meta jkun użat il-kontroll abjotiku sterili, wettaq il-kalkolazzjoni tal-perċentali tad-degradazzjoni abjotika bl-użu:% degradazzjoni abjotika

$$\%\text{degradazzjoni abjotika} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

Meta:

$C_{s(o)}$ = DOC Il-konċentrazzjonini sterili tal-kontroll fil-jum 0

$C_{s(t)}$ = DOC Il-konċentrazzjonini sterili tal-kontroll fil-jum t

I.8. RAPPURTAĠĠ

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— is-sustanzi tat-test u tar-referenza, u il-purità tagħhom,

— il-kondizzjoni tat-test,

— inoculum: is-sit(i) tan-natura u l-kampjunar, konċentrazzjonini u xi trattament ta' pre-kondizzjonar;

— il-proporzjon u n-natura tal-iskart industriali preżenti fid-drenaġġ, jekk magħruf;

— iż-żmien u t-temperatura tat-test;

— fil-każ ta' kimika tat-test li ma tantx tinħall, it-trattament mogħti;

— il-metodu tat-test applikat; ir-raġinijiet xjentifiċi u l-ispejagazzjoni għandha tkun mogħtija għal xi tibdil tal-proċedura;

— il-folja tad-data;

— kwalunkwe fenomena ta' l-inibizzjoni;

— xi degradazzjoni abjotika osservata;

— id-data speċifika kimika analitika, jekk disponibbli;

— id-data analitika dwar l-intermedjati, jekk disponibbli;

— il-grafika tad-degradazzjoni perċentwali kontra l-ħin għat-test u s-sustanzi ta' referenza; il-fażi li ddewwem il-process, il-fażi tad-degradazzjoni, il- perijodu ta' 10 ijiem u l-linja għandha kjarament tkun indikata (l-Anness I). Jekk it-test ikun konformi mal-kriterja tal-validità, l-medja tal- perċentwali tad-degradazzjoni fil-garafini li jkun fihom is-sustanza tat-test tista tkun użata għall-grafika.

— perċentwal tat-tneħħija eata l-perijodu ta' 10 ijiem, u l-linja lixxa fil-quċċata jew fit-tmiem tat-test.

PARTI II. **DOC TEST TAT-TNEĦĦIJA TAL-KULUR** (Metodu C.4-A)

II.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata li jkun fiha konċentrazzjonini magħrufa tas-sustanza tat-test 10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju organiku jkun mogħti l-arja fid-dlam jew fid-dawl baxx fi 22 ± 2 °C.

▼B

Id-degradazzjoni hija segwita bl-analiżi DOC matul intervalli frekwenti matul perijodu ta' 28 jum. Il-grad tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat bl-espressjoni tal-konċentrazzjoni DOC imneħħija (ikkorreġuta għal dak fil-kontroll ta' l-inoculum fl-imbjank) bħala perċentwali tal-konċentrazzjoni inizjali preżenti. Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni.

II.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

11.2.1. **Apparat**

(a) Garafini koniċi, eż. 250 ml sa 2 l, jiddependi mill-volum meħtieġ għall- analiżi DOC;

(b) Magna taċ-ċekċik li tista takkomoda l-garafini koniċi, jew bil-kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata fit-temperatura kostanti tal-kamra, u forza suffiċjenti tal-potenza għaż-żamma tal-kondizzjonijiet etobiċi fil-garafini kollha;

(ċ) Apparat tal-filtrazzjoni, b'membrani xierqa;

(d) Analiżattur DOC;

(e) Apparat għad-determinazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb;

(f) Ċentrifuga.

11.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 10 ml tat-taħlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-taħlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

11.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: ħama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u ħamrija jew minn taħlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

11.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Bħala eżempju, introduċi 800 ml porzjonijiet tal-medja minerali ġewwa garafini koniċi 2 l u żid volumi suffiċjenti tat-taħlitiet bil-lest tat-test u tas-sustanzi ta' referenza mal-garafini separati sabiex takkwista konċentrazzjoni kemikali ekwivalenti għal 10-40 mg DOC/l. Ivverifika l-valuri pH u aġġusta, jekk meħtieġ, għal 7,4. Inokula l-garafini b'ħama' attivita jew b'sorsi oħrajn ta' l-inocula (ara I.6.4.), sabiex takkwista konċentrazzjoni mhux aktar minn 30 mg solidi sospiżi fil-litru. Ipprepara wkoll il-kontrolli ta' l-inoculum fil-medja minerali imma mingħajr il-kimika tat-test jew ta' referenza.

Jekk meħtieġ, uża reċipjent wieħed sabiex tivverifika l-possibbiltà ta' l-effett inibitorju tal-kimika tat-test bl-inokulazzjoni tat-taħlita li jkun fiha, fil-medja minerali, konċentrazzjonijiet komparabbli kemm tal-kimika tat-test u dik ta' referenza.

Ukoll, jekk meħtieġ, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradata abjotikament bl-użu tat-taħlita mhux inokulata tal-kimika (ara I.6,6.).

▼B

B'mod addizzjonali, jekk ikun hemm suspett li l-kimika tat-test tkun sinifikament assorbita fuq il-ħġieġ, ħama' eċċ., wettaq assessjar preliminari sabiex tkun determinata l-medda possibbli ta' l-assorbazzjoni u b'hekk l-adattabbiltà tat-test għall-kimika (ara t-Tabella 1). Organizza garafina li jkun fiha s-sustanza tat-test, l-inculum u l-aġent sterilizzanti.

Wassal il-volumi fil-garafini kollha għal 1:1 bil-medja minerali u, wara t-taħwib, ħu kampjun minn kull garafina sabiex tiddetermina l-konċentrazzjonini inizjali ta' DOC (ara l-Anness II,4). Għatti l-ftugħ tal-garafini, eż. b'liega ta' l-aluminju, b'tali mod hekk li tippermetti l-iskambju ħieles ta' l-arja bejn il-garafina u l-atmosfera tal-madwar. Imbagħad deffes ir-reċipjenti fil-magna taċ-ċekċik għall-bidu tat-test.

11.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test,

Il-garafini 3 u 4: L-imbjank ta' l-inoculum,

Il-garafina 5: Proċedura tal-kontroll preferibbilment

u meta meħtieġ:

Il-garafina 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Il-garafina 7: Kontroll ta' l-adsorbazzjoni

Il-garafina 8: Kontroll tat-tossiċità

Ara wkoll I.6.7.

II.2.6. **It-twettieq tat-test**

Matul it-test, iddetermina l-konċentrazzjonijiet ta' DOC f'kull garafina b'mod doppju f'intervalli tal-ħin magħruf, ta' spiss b'mod suffiċjenti sabiex tkun tista tiddetermina l-bidu tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-persentaġġ tat-tneħħija fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem. Ħu biss il-volum minimu tas-sospenzjoni tat-test meħtieġ għal kull determinazzjoni.

Qabel il-kampjunar għamel tajjeb għat-telf ta' l-evaporazzjoni mill-garafini biż-żieda ta' ilma tat-trattib (I.6.1) fl-ammont meħtieġ, jekk ikun neċessarju. Ħawwad il-medja tal-kultura sewwa qabel ma tiġbed il-kampjun u assigura li l-materjal li jeħel mal-ġnub tar-reċipjenti jkun imdewweb jew sospiż qabel il-kampjunar. Immedjetament iffiltra mill-membrana jew b'ċentrifuga (ara l-Anness II.4) wara li jkun inġabar il-kampjun. Analizza l-kampjuni tal-filtrat jew taċ-ċentrifuga l-istess jum, altrimentri aħżen fi 2-4 ^{o}C għal massimu ta' 48 siegħa, jew f'anqas minn 18 ^{o}C għal perijodu twil.

II.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

II.3.1. **Trattament tar-riżultati**

Ikkalkola l-persentaġġ tad-degradazzjoni fil ħin kif mogħti taħt I.7.1. (determinazzjoni DOC) u, preferibbilment, taħt I.7.2. (analiżi speċifika).

Irreġistra r-riżultati kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

▼B

11.3.2. **Validità tar-riżultati**

Ara I.5.2.

11.3.3. **Rappurtaġġ**

Ara I.8.

II.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST DOK TAT-TNEĦĦIJA TAL-KULU R

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/l bħala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, għal: mg/l bħala kimika

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/l

5. **DETERMINAZZJONI TAL-KARBONJU**

Analizzatur tal-karbonju:

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/I)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Kimika tat-test flimkien ma l-inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, medja $C_{a(t)}$					
	2	b^1					
		b^2					
		b, medja $C_{b(t)}$					

▼B

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/I)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Inoculum fl-imbjank mingħajr il-kimika tat-test	3	c_1					
		c_2					
		c, medja $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medja $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALWAZZJONI TAD-DATA MHIX ITTRATTATA**

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Medja (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D1 u D_2 m'għandhiex tittieħed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **KONTROLLI ABJOTICI** (voluntarji)

	Żmien (jiem)	
	0	t
Konċ. DOC (mg/l) f'kontroll sterili	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\text{degradazzjoni abjotika} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALŻI TA' KIMIKA SPECIFIKA** (voluntarja)

	ammont residwu tal- kimika tat-test fit-tmiem (mg/l)	% degradazzjoni primarja tat-test
Kontroll sterili	S_b	

▼B

	ammont residwu tal- kimika tat-test fit-tmiem (mg/l)	% degradazzjoni primarja tat-test
Medja tat-test inokulat	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTI III. **TEST TA' L-GĦAŻLA OECD MODIFIKATA** (Metodu ^{o}C.4-B)

III.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata li jkun fiha konċentrazzjoni magħrufa tas-sustanza tat-test (10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju huwa inokulat b' 0,5 ml effluwent kull litru tal-medja. It-taħlita hija mogħtija l-arja fid-dlam jew f'dawl baxx ħafna fi 22 ± 2 ^{o}C.

Id-degradazzjoni hija segwita bl-analiżi DOC matul intervalli frekwenti matul perijodu ta' 28 jum. Il-grad tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat bl-espressjoni tal-konċentrazzjonini DOC imneħħija (ikkorreġuta għal dak fil-kontroll ta' l-inoculum fl-imbjank) bħala perċentwali tal-konċentrazzjonini inizjali preżenti. Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni.

III.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

III.2.1. Apparat

a) Garafini koniċi, eż. 250 ml sa 2 1itri, jiddependi mill-volum meħtieġ għall-analiżi DOC;

b) Magna taċ-ċekċik – li tista takkomoda l-garafini koniċi, jew bil-kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata fit-temperatura kostanti tal-kamra, u forza suffiċjenti tal-potenza għaż-żamma tal-kondizzjonijiet etobiċi fil- garafini kollha;

ċ) Apparat tal-filtrazzjoni, b'membrani xierqa;

d) Analiżattur DOC;

e) Apparat għad-determinazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb;

f) Ċentrifuga.

III.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 10 ml tat-taħlita (a) ma 80 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-taħlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

Dan il-metodu jiża biss 0,5 ml effluwent/litru bħala inoculum u għalhekk il-medja jista jkun li tkun teħtieġ li tkun imsaħħa b'elementi traċċa u fatturi tat-tkabbir. Dan huwa magħmul biż-żieda ta' 1 ml kull wieħed mat-taħlitiet li ġejjin għal kull litru tal-medja finali:

▼B

Taħlita ta' l-element traċċa:

Tetraidrat tas-sulfat tal-magnežja, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Aċidu Boriku, H_3BO_3	57,2 mg
Ħepaidrat tas-sulfat taż-żingu, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Ammonium heptamolybdate $(NH_4)_6$ Mo_7O_{24}	34,7 mg
Fe-ċelat ($FeCl_3$ aċidu ethylenediamine-tetra-aċetiku)	100,0 mg
Dewweb fi, u wassal għal 1 000 ml bl-ilma tat-trattib	
Taħlita tal-vitamina:	
Estratt tal-ħmira	15,0 mg

Dewweb l-estratt tal-ħmira fi 100 ml ilma. Sterlizza bil-passaġġ minn membrana 0,2 mikronji, jew għamilha friska.

III.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jkun akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Ara I.6.4.2. u I.6.5.

0,5 ml kull litru tal-medja minerali hija użata.

III.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Bħala eżempju, introduċi 800 ml porzjonijiet tal-medja minerali ġewwa garafini koniċi 2 l u żid volumi suffiċjenti tat-taħlitiet bil-lest tat-test u tas-sustanzi ta' referenza mal-garafini separati sabiex takkwista konċentrazzjoni kemikali ekwivalenti għal 10-40 mg DOC/l. Ivverifika l-valur pH u aġġusta, jekk meħtieġ, għal 7,4. Innokula l-garafini fl-effluwent tad-drenaġġ fi 0,5 ml/litru (ara I.6.4.2.). Ippreparata wkoll il-kontrolli ta' l-inoculum fil-medja minerali mingħajr il-kimika tat-test jew ta' referenza.

Jekk meħtieġ, uża reċipjent wieħed sabiex tivverifika l-possibbiltà ta' l-effett inibitorju tal-kimika tat-test bl-inokulazzjoni tat-taħlita li jkun fiha, fil-medja minerali, konċentrazzjonijiet komparabbli kemm tal-kimika tat-test u dik ta' referenza.

Ukoll, jekk meħtieġ, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradat abjotikament bl-użu tat-taħlita mhix inokulata tal-kimika (ara I.6,6.).

B'mod addizzjonali, jekk ikun hemm suspett li l-kimika tat-test tkun sinifikament adsorbita fuq il-ħġieġ, ħama' eċċ., wettaq assessjar preliminari sabiex tkun determinata l-medda possibbli ta' l-adsorbazzjoni u b'hekk l-adattabbiltà tat-test għall-kimika (ara t- Tabella 1). Organizza garafina li jkun fiha s-sustanza tat-test, l-inculum u l-aġent sterilizzanti.

Wassal il-volumi fil-garafini kollha għal 1:1 bil-medja minerali u, wara t-taħwib, ħu kampjun minn kull garafina sabiex tiddetermina l-konċentrazzjonini inizjali ta' DOC (ara l-Anness II,4). Għatti l-ftugħ tal-garafini, eż. b'liega ta' l-aluminju, b'tali mod hekk li tippermetti l-iskambju ħieles ta' l-arja bejn il-garafina u l-atmosfera tal-madwar. Imbagħad deffes ir-reċipjenti fil-magna taċ-ċekċik għall-bidu tat-test.

▼B

III.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garafini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Il-garafini 5: Proċedura tal-kontroll

Preferibbilment u meta meħtieġ:

Il-garafini 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Il-garafini 7: Kontroll ta' l-adsorbazzjoni

Il-garafini 8: Kontroll tat-tossiċità

Ara wkoll I.6.7.

III.2.6. **It-twettieq tat-test**

Matul it-test, iddetermina l-konċentrazzjoninijiet ta' DOC f'kull garafina b'mod doppju f'intervalli tal-ħin magħruf, ta' spiss b'mod suffiċjenti sabiex tkun tista tiddetermina l-bidu tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-ersentaġġ tat-tneħħija fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem. Ħu biss il-volum minimu tas-sospenzjoni tat-test meħtieġ għal kull determinazzjoni.

Qabel il-kampjunar għamel tajjeb għat-telf ta' l-evaporazzjoni mill-garafini biż-żieda ta' ilma tat-trattib (I.6.1) fl-ammont meħtieġ, jekk ikun neċċessarju. Ħawwad il-medja tal-kultura sewwa qabel ma tiġbed il-kampjun u assigura li l-materjal li jeħel mal-ġnub tar-reċipjenti jkun imdewweb jew sospiż qabel il-kampjunar. Immedjatament iffiltra mill-membrana jew b'ċentrifuga (ara l-Anness II.4) wara li jkun inġabar il-kampjun. Analizza l-kampjuni tal-filtrat jew taċ-ċentrifuga l-istess jum, altrimentri aħżen fi 2-4 °C għal massimu ta' 48 siegħa, jew f'anqas minn 18 °C għal perijodu twil.

III.3. DATA URAPPORTAĠĠ

III.3.1. **Trattament tar-riżultati**

Ikkalkola l-persentaġġ tad-degradazzjoni fil ħin ta' kif mogħti taħt I.7.1. (determinazzjoni DOC) u, voluntarjament, taħt I.7.2. (analiżi speċifika).

Irreġistra r-riżultati kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

III.3.2. Validità tar-riżultati

Ara I.5.2.

III.3.3. Rappurtaġġ

Ara I.8.

III.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST MODIFIKAT TAL-GĦAŻLA OECD

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

▼B

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru bħala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, għal: mg/litru bħala kimika

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/l

5. **DETERMINAZZJONI TAL-KARBONJU**

Analizzatur tal-karbonju:

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/I)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Kimika tat-test flimkien ma l-inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, medja $C_{a(t)}$					
	2	b^1					
		b^2					
		b, medja $C_{b(t)}$					
Inoculum fl-imbjank mingħajr il-kimika tat-test	3	c_1					
		c_2					
		c, medja $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medja $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALWAZZJONI TAD-DATAMHIX ITTRATTATA**

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Medja (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 u D_2 m'għandhiex tittieħed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **KONTROLLI ABJOTICI** (voluntarji)

	Żmien (jiem)	
	0	t
Konċ. DOC (mg/l) f'kontroll sterili	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\text{degradazzjoni abjotika} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALŻI TA' KIMIKA SPECIFIKA** (voluntarja)

	Ammont residwu tal-kimika tat-test fit-tmiem	% degradazzjoni primarja tat-test
Kontroll sterili	S_b	
Medja tat-test inokulat	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTI IV. **TEST TA' L-EVOLUZZJONU CO_2 (METODU ^{o}C.4-C)**

IV.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali innokulata li jkun fiha konċentrazzjoni magħrufa tas-sustanza tat-test 10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju organiku jkun mogħti l-arja fid-dlam jew fid-dawl baxx. Id-degradazzjoni hija segwita matul 28 jiem bid-determinazzjoni tad-diossidu tal-karbonju prodott, li huwa marbut fil-barju jew fl-idossidu tas-sodju u li huma mkejjel bit-titrazzjoni ta' l-idrossu residwu bħala karbonju mhux organiku. L-ammont tad-diossidu tal-karbonju prodott mit-test kimiku (ikkorreġut għal dak derivat mill-inoculum fl-imbjank (huwa espress bħala persentaġġ ta $ThCO_2$. Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni.

▼B

IV.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

IV.2.1. **Apparat**

a) Garafini, 2-5 litri, kull waħda mgħammra b'tubu ta' l-arjazzjoni li jwassal sa kważi il-qiegħ tar-reċipjent u bi ħruġ;

b) Ħawwada manjetiċi, għal meta jsir l-assessjar tal-kimika li ma tantx tinħall;

ċ) Flixkien ta' assorbazzjoni tal-gass;

d) Apparat għal kontroll u l-kejl tan-nixxija ta' l-arja;

e) Apparat għat-tindig tad-diossidu tal-karbonju, għall-preparazzjoni ta' l-arja li hija ħielsa mid-dossidu tal-karbonju; jew b'mod alternattiv, taħlita ta' CO_2 ħieled mill-ossiġenu u CO_2 ħieles min-nitroġenu, minn ċilindri tal-gass fil-proporzjonijiet korretti (20 % O_2: 80 % N_2) jistgħu ikunu wżati;

f) Apparat għad-determinazzjoni tad-diossidu tal-karbonju, jew b'mod titrimetriku jew inkella f'xi għala ta' l-analizzatur tal-karbonju mhux- organiku;

g) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);

h) Analiżattur DOC (voluntarju).

IV.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 10 ml tat-taħlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-taħlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

IV.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: ħama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u ħamrija jew minn taħlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

IV.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Bħala eżempju, il-volumi u l-piżijiet li ġejjin jindikaw il-valuri għal garafini ta' 5-litri li jkun fihom 3 litri ta' sospensjoni. Jekk volumi iżgħar ikunu wżati, immodifika l-valuri kif meħtieġ, imma assigura li d-diossidu tal-karbonju iffurmat jista jkun imkejjel bl-eżatezza.

Ma kull garafina ta' 5 litri żid 2 400 ml tal-medja minerali. Żid volum xieraq tal-ħama' attivata ippreparata (ara I.6.4.1 u I.6.5.) sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi ta' mhux aktar minn 30 mg/l fit-taħlita finali 3 l ta' l-inokulat. B'mod alternattiv, l-ewwel dewweb il-ħama' ippreparata sabiex takkwista sospensjoni ta' 500-1 000 mg/l fil-medja minerali qabel ma żżid alikwott mal-kontenuti tal-garafina ta' 5-litri sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' 30 mg/l; dan jassigura preċiżjoni akbar. Sorsi oħrajn ta' l-inoculum jistgħu ikunu wżati (ara I.6.4.2.).

Daħħal l-arja f'dawn it-taħlitiet tal- CO_2 ħieles mill-arja matul il-lejl sabiex titnaddaf is-sistema mid-diossidu tal-karbonju.

▼B

Żid il-materjal tat-test u s-sustanza ta' referenza, separatament, bħala volum magħruf tat-taħlitiet lesti, f'garafini kopji sabiex takkwista l-konċentrazzjonijiet, kontribwiti biż-żieda tal-kimika, ta' 10 sa 20 mg DOC jew TOC/l; ħalli wħud mill-garafini mingħajr iż-żieda tal-kimika bħala kontrolli ta' l-inoculum. Żid sustanzi tat-test li jinħallu bilmod direttament fil-garafini u iżen jew ikkalkula il-bażi tal-volum u opera kif deskritt fl-Anness III.

Jekk meħtieġ, uża garafina waħda sabiex tivverifika l-effett inibitorju possibbli tat-kimika tat-test biż-żieda kemm tal-kimika tat-test u tar-referenza fl-istess konċentrazzjonijiet kif preżenti fil-garafini l-oħrajn.

Ukoll, jekk meħtieġ, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradat abjotikament bl-użu tat-taħlita mhux inokulata tal-kimika (ara I.6,6.). Sterilizza biż-żieda ta' sustanza tossika fil-konċentrazzjoni xierqa.

Wassal il-volumi tas-sospenzi fil-garafina kollha għal 3 litri biż-żueda ta' medja minerali li preċedentament mogħtija l-arja bi CO_2 ħieles mill-arja. B'mod operattiv, il-kampjuni jistgħu ikunu miġbura għall-analiżi DOC (ara l-Anness II.4(u/jew analiżi speċifika. Waħħal il-flixkien ta' l-assorbazzjoni mal-ħruġ tal-ġarafini.

Jekk ikun użat l-idrossidu tal-barju, waħħal tlett fliexken ta' l-assorbazzjoni, b'kull wieħed ikun fih 100 ml ta, 0,0125 M taħlita ta' l-idrossidu tal-barju, f'serje ta' garafini ta' 5-litri 'l wieħed. It-taħlita għandha tkun ħielsa mis-sulfat u l-karbonat preċipitat u s-saħħa tagħha għandhom ikunu determinati immedjatament qabel l-użu. Jekk ikun użat l-idrossidu tas-sodju, waħħal żewġ nasses, it-tieni taġixxi bħala kontroll għad-demostrazzjoni li d-diossidu tal-karbonju kollu kien assorbit fl-ewwel wieħed. Fliexken ta' l-assorbazzjoni mgħammra b'għeluq tal-flixkun tas-serum huma adatti. Żid 200 ml 0,05 M idrossidu tas-sodju ma kull flixkun, li huwa suffiċjenti sabiex jassorbixxi l-kwantità totali tad-diossidu tal-karbonju evolut meta l-kimika tat-test tkun kompletament degradata. It-taħlita ta' l-idrossi tas-sodju, anki meta ippreparata friska, ikun fiha traċċi tal-karbonati, dan huma ikkorreġut bit-tnaqqis tal-karbonat fl-imbjank.

IV.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garafini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Garafina 5: Proċedura tal-kontroll u,

preferibbilment u meta meħtieġ:

Garafina 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Garafina 7: Kontroll tat-tossiċità

Garafina 8: Kontroll tat-tossiċità Ara wkoll I.6.7.

IV.2.6. **It-twettieq tat-test**

Ibda t-test bit-tbaqbieq ta' CO_2 ħieles mill-arja matul is-sospenzjoni bir-rata ta' 30-100 ml/min. Iġbor il-kampjuni ta' l-assorbent diossidu tal-karbonju perjodikament għall-analiżi tal-kontenut CO_2. Matul l-ewwel għaxart ijiem huwa rakkomndat li l-analiżi għandha tkun imwettqa fit-tieni jew fit-tielet jum u imbagħad kull ħames jum sat-28 jum ħekk li l-perijodu ta' l-10 ijiem jista jkun identifikat.

▼B

Fit-28 jum, iġbor il-kampjuni (voluntarja) għall-analiżi DOC u/jew speċifika, kejjel il-pH tas-sospenzjoni u żid 1 ml ta' l-aċidu idrokloriku ikkonċentrar ma kull garafina; agħti l-arja lill-garafini matul il-lejn sabiex twarrab id-diossidu tal-karbonju preżenti fis-sospenzjonijiet tat-test. Fil-jum 29 agħmel l-aħħar analiżi tad-diossidu tal-karbonju evolut.

Fil-jiem tal-kejl ta' CO_2, aqla l-assorbatur ta' l-idrossidu tal-barju l-ebreb lejn il-garafina, ittitra t-taħlita ta' l-idrossidu bi HCl 0,05 M bl-użu tal-fenilftalejn bħala indikatur. Mexxi l-assorbaturi li jkun fadat post aktar qrib tal-garafina u poġġi assorbatur ġdid li jkun fih 100 ml ta' l-idrossidu tal-barju frisk 0,0125 M fit-tarf imbiegħed tas-serje. Wettaq titrazzjonijiet kif meħtieġ, per eżempju, meta l-preċipitazzjoni sostanzjali hija murija fl-ewwel nassa u qabel ma jkun evidenti fit-tieni, jew mill-anqas darba fil-ġimgħa. B'mod alternattiv, bi NaOH bħala assorbatur, iġbed b'siringa kampjun żgħir (jiddependi mill-karatteristiċi ta' l-analizzatur tal-karbonju użat) tat-taħlita ta' l-idrossidu tas-sodju fl-assorbatur l-eqreb lejn il-garafina. Injetta direttament il-kampjun fil-parti IC ta' l-anilizzatur tal-karbonju għall-analiżi tad-diossidu tal-karbonju evolut.

Analizza l-kontenuti tat-tieni nassa biss fit-tmiem tat-test sabiex tikkorieġi għal xi ammont żejjed tad-diossidu tal-karbonju.

IV.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

IV.3.1. **Trattament tar-riżultati**

L-ammont ta' CO_2 fin-nassa ta' l-assorbatur meta ittrat huwa mogħti bi:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

meta:

V = il-volum ta' HC1 użat għat-titrazzjoni tal-100 ml fl-assorbatur (ml).

C_B = il-konċentrazzjoni tat-taħlita ta' l-idrossidu tal-barju (M),

C_A = l-konċentrazzjoni tat-taħlita ta' l-aċidu idrokloriku (M),

jekk C_B jkun 0,0125 M u C_A huwa 0,05 M, it-titrazzjoni għal 100 ml idrossidu tal-barju hija 50 ml u l-piż ta' CO_2 huwa mogħti bi:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrated} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Hekk, f'dan il-każ, sabiex il-volum ta' HC1 titrat ikun ikkopnvertit għal mg tas-CO_2 prodott, il-fattur huwa 1,1.

Ikkalkola l-piżijiet ta' CO_2 prodott biss mill-inoculum u mill-iconulum flimkien mal-kimika tat-test bl-użu tal-valuri rispettivi tat-titrazzjoni u d-differenza fil-piż ta' CO_2 prodott biss mill-kimika tat-test.

Per eżempju, jekk l-inoculum biss jagħti titrazzjoni ta' 48 ml u l-inoculum flimkien mal-kimika tat-test jagħti 45 ml,

$$CO_2 \text{ mill-inoculum} = 1{,}1 \times (50\text{-}48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 mill-inoculum flimkien mal-kimika tat-test = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

u bhekk il-piż ta' CO_2 prodott mill-kimika tat-test hija 3,3 mg.

Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat minn:

$$\% \text{ degradażżjoni} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ prodott} \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg kimika tat} - \text{test miżjuda}}$$

jew,

$$\% \text{ degradażżjoni} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ prodott} \times 100}{\text{mg TO miżjud mit} - \text{test} \times 3{,}67}$$

3,67 ikun il-fattur tal-konverżjoni (44/12) għall-karbonju tad-diossidu tal-karbonju.

Akkwista l-persentaġġ tad-degradazzjoni wara kwalunkwe intervall ta' ħin biż-żieda tal-persentaġġ tal-valuri $ThCO_2$ ikkalkolat għal kull waħda mill-jiem, sa dak il-ħin, li fih ikun imkejjel.

Għall-assorbaturi idrossidu tas-sodju, ikkalkola l-ammont tad-diossidu tal-karbonju prodott, espressa bħala IC (mg), bil-moltiplikazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' IC fl-assorbent bil-volum ta' l-assorbent.

Ikkalkula l-persentaġġ tad-degradazzjoni minn:

$$\% \text{ of } ThCO_2 = \frac{\text{mg IC garafina} - \text{mg IC imbjank}}{\text{MG TOC miżjud bħala kemikali għat} - \text{test}} \times 100$$

Ikkalkola DOC imneħħija (voluntarja) kif deskritt taħt 1.7. Irreġistra dawn u r-riżultati l-oħrajn kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

IV.3.2. **Validità tar-riżultati**

Il-kontenut IC tas-sospenzjoni tal-kimika tat-test fil-medja minerali fil-bidu tat-test għandu jkun anqas minn 5 % tal-TC, u t-total CO_2 ta' l-evoluzzjoni ta' l-inoculum fl-imbjank fit-tmiem tat-test għandu normalment jeċċedi 40 mg/l medja. Jekk valuri akbar minn 70 mg CO_2/litru jkunu akkwistati, id-data u t-teknika sperimentali għandha tkun eżaminata b'mod kritiku.

Ara wkoll I.5.2.

IV.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

IV.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST TA' L-EVOLUZZJONI TAD-DIOSSIDU TAL-KARBONJU

(1) **LABORATORJU**

(2) **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

(3) **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru bħala kimika

▼B

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja: mg/litru bħala kimika

Total C miżjud mal-garafina: mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/litru

Ħin (jum)	CO_2 iffurmat Test (mg)		CO_2 iffurmat imbjank (mg)		CO_2 iffurmat Kumulattiv (mg) (Il-medja ta' l-imbjank *minus* tat-test)		$ThCO_2$ Kumulattiv $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	medja	3 / 4	medja	1	2	1	2	medja
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Nota: formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità

6. **ANALIŻI TAL-KARBONJU** (voluntarju)

Analizzatur tal-karbonju:

Żmien (jiem)	Imbjank mg/l	Kimika tat-test mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) jew fl-aħħar ta' l-inkubazzjoni.

▼B

$$\% \text{ DOC imneħħi} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADAZZJONI ABJOTIKA** (voluntarja)

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{CO_2\text{il} - \text{formazzjoni f'garafina sterlili wara 28 jum (mg)}}{ThCO_2(\text{mg})} \times 100$$

PARTI V. **TEST TAR-RESPIROMETRIJA MANJOMETRIKA** (Metodu C.4-D)

V.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata, li jkun fiha konċentrazzjoni magħrufa tal-kimika tat-test (100 mg/litru tas-sustanza tat-test, li tagħti mill-anqas 50-100 mg ThOD/litru) bħala s-sorsi unika nominali tal-karbonju organiku, hija mħawwda f'garafina magħluqa f'temperatura kostanti (± 1 °C jew eqreb) għal sa 28 jum. Il-konsum ta' l-ossiġenu huwa determinat jew bil-kejl tal-kwanità ta' ossiġenu (prodott b'mod elettolitiku) meħtieġ għaż-żamma tal-volum tal-gass fil-garafina respirimetru, jew bit-tibdil fil-volum jew fil-pressjoni (jew ġemgħa tat-tnejn) fl-apparat. Id-diossidu tal-karbonju evolu huwa assorbit fit-taħlita ta' l-idrossidu tal-putassa jew f'xi assorbent xieraq ieħor. L-ammont ta' ossiġenu akkwistat bil-kimika tat-test (ikkorreġut għall-akwista mill-inoculim fl-imbjank, imwettaq b'mod parallel) huwa espress bħala persentaġġ ta' ThOD jew COD. B'mod voluntarju, il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, u fl-aħħar mill-aħħar il-biodegredazzjoni bl-analiżi DOC..

V.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

V.2.1. **Apparat**

a) respirometru xieraq;

b) kontroll tat-temperatura, żamma ta' ± 1 °C jew aħjar;

ċ) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);

d) analizzatur tal-karbonju (voluntarju).

V.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 10 ml tat-taħlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-taħlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

V.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: ħama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u ħamrija jew minn taħlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

V.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Ipprepara t-taħlitiet għat-test u l-kimika tar-referenza, f'lottijiet separati, f'medja minerali ekwivalenti għal konċentrazzjoni, normalment, ta' 100 mg kimika/litru (li tagħti mill-anqas 50-100 mg ThOD/litru), bl-użu tat-taħlitiet bil-lest.

▼B

Ikkalkola il-ThOD fuq il-bażi tal-formazzjoni ta' l-imluħa ta' l-ammonium, sakemm nitrifikazzjoni tkun antiċipata, meta l-kalkolazzjoni għandha tkun ibbażata fuq il-formazzjoni nitrika (ara l-Anness II.2.)

Iddetermina l-valuri pH u aġġusta, jekk meħtieġ, għal 7,4. ± 0,2.

Sustanzi li ma tantx jinħallu għandhom ikunu miżjuda fi stadju aktar tard (ara hawn taħt).

Jekk it-tossiċita tal-kimika tat-test għandha tkun determinata, ipprepara taħlita oħra fil-medja minerali li jkun fiha kemm il-kimika tat-test u tar-referenza fl-istess konċentrazzjonijiet bħal fit-taħlitiet individwali.

Jekk il-kejl tat-teħid fiżiku-kimiku ta' l-ossiġenu huwa meħtieġ, ipprepara taħlita tal-kimika tat-test fi, mormalment, 100 mh ThOD/-litru li tkun ġiet sterilizzata biż-żieda ta' sustanza tassika adatta (ara I.6,6.).

Introduċi l-volum meħtieġ tat-taħlitiet tal-kimika tat-test u ta' referenza, rispettivament, mill-anqas fil-garafini duplikati. Żid ma garafini oħrajn il-medja minerali biss (għal kontrolli ta' l-inoculum) u, jekk meħtieġ, it-taħlita tal-kimika tat-test imħallta/ta' referenza, u t-taħlita sterili.

Jekk il-kimika tat-test ma tantx tkun tinħall, żid sustanzi tat-test li jinħallu bil-mod direttament fil-garafini u iżen jew ikkalkula l-bażi tal-volum u opera kif deskritt fl-Anness III. Żid l-idrossidu tal-putazza, gerbubi tal-ġir tas-soda jew assorbent ieħor mal-kompartimenti assorbatur CO_2.

V.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garafini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Il-garafini 5: Proċedura tal-kontroll preferibbilment, u meta meħtieġ:

Il-garafini 6: Kontroll sterili

Il-garafini 7: Kontroll tat-tossiċità

Il-garafini 8: Kontroll tat-tossiċità

Ara wkoll I.6.7.

V.2.6. **It-twettieq tat-test**

Ħalli l-garafini jilħqu t-temperatura mixtieqa u inokula r-reċipjenti xierqa bil-ħama' attivata ippreparata jew b'sors ieħor ta' l-inoculum sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi ta' mhux aktar minn 30 mg/litru. Ħejji l-apparat, qabbad il-ħawwadi u ivverifika li ma tgħaddix arja, u ibda bil-kejl tat-teħid ta' l-ossiġenu. Normalment l-ebda attenzjoni oħra m'hija meħtieġa apparti milli t-teħid tal-qari u tal-virifika odjerna sabiex tara li t-temperatura korretta u t-taħwis adekwat ikun mantenut.

Ikkalkola t-teħid ta' l-ossiġenu mill-qari meħuda f'intervalli regolati u ta' spiss, bl-użu tal-motodi rakkomandati mill-manifattur ta' l-apparat. Fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, normalment 28 jum, kejjel il-pH tal-kontenuti tal-garafini, speċjalment jekk it-teħid ta' l-ossiġenu jkun baxx jew aktar minn $ThODNH_4$ (għal komposti li jkun fihom in-nitroġenu).

▼B

Jekk meħtieġ, neħħili l-kampjuni mill-garafini respirometri, inizjalment u finalment, għall-analiżi ta' DOC jew kimika speċifika (ara l-Anness II.4). Fit-tneħħija inizjali, assigura li l-volum tas-sospensjoni tat-test li jkun baqa' fil-garafina, jkun magħruf. Meta l-ossiġenu jkun meħud mis-sustanza tat-test li jkun fiha l-N, iddetermina ż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat u wettaq in-nitrazzjoni matul 28 jum u ikkalkola l-korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni (l-Anness V).

V.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

V.3.1. **Trattament tar-riżultati**

Iddividi l-akkwista ta' l-ossiġenu (mg) tal-kimika tat-test wara hin pre-determina (korreġut għal dak ta' l-inoculum tal-kontroll fl-imbjank wara l-istess ħin) bil-piż tat-kimika tat-test kif użata. Dan iforni il-BOD espress bħala mg ossiġenu/mg kimika tat-test, iġiefiri

$$\mathrm{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ teħid bil} - \text{kimika tat} - \text{test} - \text{mg } O_2 \text{ teħid bl}-))}{(\text{mg kimika tat} - \text{test fil} - \text{garafina})}$$

mg O_2 kull mg kimika tat-test

ikkalkola l-persentaġġ tal-biodegradazzjoni jew minn:

$$\%\ \text{bijodegradazzjoni} = \%\ \mathrm{ThOD} = \frac{\mathrm{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikali})}{\mathrm{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikali})} \times 100$$

Jew inkella minn:

$$\%\ \mathrm{COD} = \frac{\mathrm{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikali})}{\mathrm{COD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikali})} \times 100$$

Għandu jkun innotat li dawn iż-żewġ metodi mhux neċessarjament jagħtu l-istess valur, huwa preferibbli li jsir użu mill-metodu preċedenti.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom in-nitroġenu, għamel użu mill-ThOD xieraq (NH_4 jew NO_3) skond ma jkun magħruf jew mistenni dwar l-okkorrenza tan-nitrifikazzjoni (l-Anness II.2). Jekk in-nitrifikazzjoni isseħħ imma ma tkun kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

Meta determinazzjonijiet voluntarji tal-karbonju organiku u/jew ta' kimika speċifika jkun saru, ikkalkola il-persentaġġ tad-degradazzjoni, kif deskritt taħt I.7.

Irreġistra r-riżultati kollha dwara id-data fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

V.3.2. **Validità tar-riżultati**

It-teħid ta' l-ossiġenu ta' l-inoculum fl-imbjank normalment huwa 20-30 mg O_2/litru u m'għandux ikun aktar minn 60 mg/litru fi 28 jum. Valuri għola minn 60 mg/litru jkunu jeħtieġu eżaminazzjoni kritika tad-data u tat-tekniki sperimentali. Jekk il-valur tal-pH huwa l-barra mill-medda 6-8, 5 u l-konsum ta' l-ossiġenu bil-kimika tat-test huwa anqas minn 60 %, it-test għandu jkun repetut b'konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test.

Ara wkoll I.5.2.

▼B

V.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

V.4. **FOLJA TAD-DATA**

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST RESPIRATORJU MANOMETRIKU

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, C_o: mg/litru

Volum fil-garafina tat-test (V): ml

ThOD jew COD: mg O_2/mg sustanza tat-test (NH_4, NO_3)

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/l

5. **TEHID TA' L-OSSIĠENU BIODEGRADABBILITÀ**

		Jum											
		0		7		14			21			28	
O_2 upt. (mg), kimika tat-test	1												
	2												
	a, medja												
O_2 upt. (mg) imbjank	3												
	4												
	b, medja												
BOD(mg) ikkorreġut	(a_1-b_m)												
	(a_2-b_m)												
BOD kull mg tal-kimika tat-test	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Jum											
		0		7		14			21			28	
% degradazzjoni	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	Medja (*)												

V = Volum tal-medja fil-garafina tat-test
(*) D_1 u D_2 m'għandhiex tittieħed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

N.B.: Formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

6. **KORREZZJONI GĦAN-NITRIFIKAZZJONI** (ara l-Anness V)

Jum		0	28	Differenza
(i)	Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)			(N)
(ii)	Ossiġenu ekwivamenti (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)			(N)
(iv)	Ossiġenu ekwivamenti (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Ossiġenu ekwivamenti totali	—	—	

7. **ANALIŻI TAL-KARBONJU** (volontarju)

Analizzatur tal-karbonju:

Żmien (jiem)	mg/litru fl-imbjank	Kimika tat-test mg/litru
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) jew fl-aħħar ta' l-inkubazzjoni.

$$\% \text{ DOC imneħħi} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **KIMIKA SPECIFIKA** (volontarja)

S_b = konċentrazzjoni fil-fiżiko0kimika (sterili) mal-kontroll ta' 28 jum

S_a = konċentrazzjoni fil-garafina inokulta fi 28 jum.

$$\% \text{ biodegradazzjoni} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADAZZJONI ABJOTIKA** (voluntarja)

a = konsum ta' l-ossiġenu f'garafini sterili wara 28 jum, (mg)

$$\text{konsum ta}' \text{ l} - \text{ossiġenu għall kull mg tal} - \text{kimika tat} - \text{test} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(ara s-sezzjonijiet 1 u 3)

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

PARTI VI. **TEST TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ** (Metodu °C.4-E)

VI.1. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-taħlita tal-kimika tat-test f'medja minerali, normalment fi 2-5 mg/litru, hija inokulata b'relattivament numru żghir ta' mikro-organiżmi minn popolazzjoni mħallta u miżmuma fi fliexken, kompletament mimlija u magħluqa, fid-dlam u f'temperatura kostanti. Id- degradazzjoni hija segwita bl-analiżi ta' l-ossiġenu maħlul matul perijodu ta' 28 jum. L-ammont ta' ossiġenu akkwistat bil-kimika tat-test, ikkorreġut għall-akwista mill-inoculim fl-imbjank, imwettaq b'mod parallel, huwa espress bħala persentaġġ ta' ThOD jew COD.

VI.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

VI.2.1. **Apparat**

a) Fliexken BOD, b'tappini tal-ħġieġ, eż. 250-300 ml;

b) Banju ta' l-ilma jew inkubatur, għaż-żamma tal-fliexken f'temperatura kostanti (± 1 °C jew aħjar) bl-esklużjoni tad-dawl;

ċ) Fliexken tal-ħġieġ kbar (2-5 litri) għall-preparazzjoni tal-medja u għall- mili tal-fliexken BOD;

d) Elettrodu u arloġġ ta' l-ossiġenu, jew apparat u reaġenti għat-titrazzjoni Winker.

VI.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 1 (wieħed) tat-taħlita (a) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-taħwid.

VI.2.3. **Preparazzjoni ta' l-inoculum**

L-inoculum huwa normalment akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Sors alternattiv ieħor għall-inoculum hija l-ilma tal-wiċċ ta' l-art. Normalment l-użu huwa ta' taqtira waħda (0,05 ml) ma 5 ml tal-filtrat għal kull litru tal-medja; il-provi jistgħu jeħtieġ li jiskopru l-aħjar volum għal effluwent partikolari (ara I.6.4.2. u I.6.5.).

VI.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

B'mod qawwi daħħal l-arja f'medja minerali għal mill-anqas 20 minuta. Wettaq kull waħda mis-serje tat-testijiet bil-medja akkwistata mill-istess lott. Ġeneralment, il-medja hija lesta għall-użu wara li tkun qagħdet għal 20 siegħa, fit-temperatura tat-test. Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb għall-iskopijiet tal-kontroll; il-valur għandu jkun madwar 0 mg/litru fi 20 °C. Wettaq l-operazzjonijiet kollha tat-trasferiment u tal-mili tal-medja saturata bl-arja imma mingħajr bżieżaq, per eżempju, bl-użu ta' sifuni.

▼B

Ipprepara grupp paralelli ta' fliexken BOD għad-determinazzjoni tat-test u l-kimika ta' referenza f'serje sperimentali simultanji. Organizza numru suffiċjenti tal-flixkien BOD, inklużi l-inoculum fl-imbjank, sabiex tippermetti mill-anqas kejl duplikat tal-konsum ta' l-ossiġenu li jsir matul l-intervalli mixtieqa tat-test, per eżempju, wara 0, 7, 14, 21 u 28 jum. Sabiex tassigura li tkun tista tidentifika l-perijodu ta' l-10 ijiem, aktar fliexken jistgħu ikunu meħtieġa.

Żid medja minerali mimlija kollha bl-arja ma fliexken kbar hekk li jkunu mimlija għal madwar terz. Imbagħad żid taħlitiet bil-lest suffiċjenti tal-kimika tat-test u tal-kimika ta' referenza sabiex tissepara l-flixken il-kbar hekk l-konċentrazzjoni finali tal-kimika tkun normalment mhux akbar minn 10 mg/litru. M'għandhek iżżid l-ebda kimika ma l-imbjank fil-medja tal-kontroll li tkun fi flixkun kbir ieħor.

Sabiex tassigura li l-attività ta' l-inoculum ma tkunx limitata, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb m'għandhiex tinżel aktar baxxa minn 0,5 mg/litru fil-fliexken BOD. Dawn jillimitaw il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test għal madwar 2 mg/litru. B'dana kollu, għal komposti b'degradibbiltà baxxa u dawk bi ThOD baxxa, 5-10 mg/litru jistgħu ikunu wżati. F'uħud mill-każi, ikun rakkommandabbli li twettaq b'mod parallel serje tal-kimika tat-test f'żewġ konċentrazzjonijiet differenti, per eżempju, 2 u 5 mg/litru. Normalment, għandhek twettaq il-kalkolu tal-ThOD fuq il-bażi tal-formazzjoni tal-melħ ta' l-ammonium, imma, jekk in-nitrifikazzjoni tkun mistennija jew ikun magħruf li sseħħ, agħmel il-kalkolu fuq il-bażi tal-formazzjoni tan-nitrat ($ThOD_{NO3}$: ara l-Anness II.2). B'danakollu, jekk in-nitrifikazzjoni ma tkunx kompluta imma isseħħ, għamel korrezzjoni għat-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat, determinati fl-analiżi, (ara l-Anness V).

Jekk it-tossiċità tal-kimika tat-test għandha tkun investigata (fil-każ, per eżempju, tal-valur preċedenti baxx tal-biodegradabbiltà li jkun ġie misjub), serje oħra ta' flixkien hija neċessarja.

Ipprepara flixkun kbir ieħor li jkun fih medja minerali bl-arja (sa madwar terz tal-volum tiegħu) flimkien mal-kimika tat-test u l-kimika ta' referenza fil-konċentrazzjoni finali normalment l-istess bħal dawk fil-fliexken kbar l-oħrajn.

Inokula t-taħlitiet fil-fliexken il-kbar b'effluwent sekondarju (qatra waħda jew madwar 0,05 ml, ma 5 ml/litru) jew b'sorsi oħra bħal ma hu l-ilma tax-xmara (ara I.6.4.2.). Finalment, wassal it-taħlitiet għall-volum b'medja minerali bl-arja bl-użu ta' manka li tilħaq sal-qiegħ tal-flixkun sabiex takkwista taħlita adekwata.

VI.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Fi prova tipika, il-fliexken li ġejjin huma wżati:

— mill-anqas 10 li jkun fihom il-kimika tat-test u ta' l-inoculum (sospenzjoni tat-test),

— mill-anqas 10 li jkun fihom biss l-inoculum (inoculum fl-imbjank),

— mill-anqas 10 li jkun fihom il-kimika ta' referenza u ta' l-inoculum (kontroll tal-proċedura),

▼B

— u, meta meħtieġ, 6 fliexken li jkun fihom il-kimika tat-test, kimika ta' referenza u l-inoculum (kontroll tat-tossiċità). B'dana kollu, sabiex tassigura li tkun tista tidentifika l-perijodu ta' l-10 ijiem, madwar id-doppju ta' fliexken jistgħu ikunu meħtieġa.

VI.2.6. It-twettieq tat-test

Forni kull taħlita ippreparata immedjetament ġewwa kull grupp rispettiv tal-fliexken BOD bil-manka mill-kwart tl-isfel (mhux mill-qiegħ) tal-flixkun kbir xieraq, ħekk li l-fliexken BOD kollha jkunu kompletament mimlija. Taptap bil-ġentilizza sabiex tneħħi xi bżieżaq ta' l-arja. Analiżża il-fliexken ħin-żero immedjetament għall-ossiġenu mdewweb bil-metodi Winkles jew bl-elettrodi. Il-kontenuti tal-fliexken jistghu jkunu preservati għal analiżi aktar tard bil-metodu Winkles biż-żieda tal-manganiż (II) sulfat jew idrossidu tas-sodju (l-ewwel reaġent Winkler). Aħżen bil-galbu l-fliexken magħluqa bl-istopponi, li jkun fihom l-ossiġentu iffissat bħala manganiż kannella (III) ossidu idrat, fid-dlam fi 10-20 °C għal mhux aktar minn 24 siegħa qabel ma tipproċedi bil-kumplament tal-passi tal-metodu Winkler. Agħmel it-tappini fuq il-kumplament tal-flixkien, tassigura li l-ebda bżieżaq ta' l-arja ma jkunu magħluqa, u inkuba fi 20 °C fid-dlam. Kull serja għandha tkun akkumpanjata b'serje paralella sħiħa għad-determinazzjoni tal-medja in-bjank inokulata. Neħħi mill-anqas il-flixkien duplikati tas-serje kollha għall-abaliżi ta' l-ossiġenu mdewweb matul l-intervalli tal-ħin (mill-anqas kull ġimgħa) matul it-28 jum ta' l-inkubazzjoni.

Kampjuni ta' kull ġimgħa għandhom jippermettu l-assessjar tat-tneħħija perċentwali fil-perijodu ta' 14-il jum, fil-waqt li l-kmpjunar ta' kull 3-4 ijiem għandu jippermetti li l-perijodu ta' 10 ijiem li jkun identifikat, li jkun jeħtieġ madwar id-doppju ta' tant fliexken.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom N, korrezzjonijiet għat-teħid ta' l-ossiġenu minn xi nitrifikazzjoni li sseħħ, għandu jsir. Sabiex isir dan, uża l-metodu ta' l-elettrodi-O_2 għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb u imbagħad warrab il-kampjun mill-flixkun BOD għall-analiżi tan-nitrit u n-nitrat. Miż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat, wettaq il-kalkolu ta' l-ossiġenu użat (ara l-Anness V).

VI.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

VI.3.1. **Trattament tar-riżultati**

L-ewwel agħmel il-kalkolu tal-BOD eżerċitat wara kull perijodu ta' żmien billi tnaqqas l-eżawriment ta' l-ossiġenu (mg O_2/litru) ta' l-inoculum fl-imbjank minn dak esibit bit-test kimiku. Iddividi dan l-eżawriment ikkorreġut bil-konċentrazzjoni (mg/litru) tal-kimika tat-test, sabiex takkwista l-BOD speċifika vġama mg ossiġenu kull mg tal-kimika tat-test. Wettaq il-kalkolu tal-persentaġġ tal-biodegradabbiltà billi tiddividi l-BOD speċifika bil-ThOD speċifika (ikkalkolata skond l-Anness II,2) jew il-COD (determinata bl-analiżi, ara l-Anness II.3),b'hekk:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ teħid bil} - \text{kimika tat} - \text{ test} - \text{mg } O_2 \text{ teħid bl} - \text{imbjank})}{(\text{mg kimika tat } - \text{test fil} - \text{garafina})}$$

▼B

mg O_2 kull mg tal-kimika tat-test

$$\% \text{ biodegradazzjoni} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikali għat} - \text{test})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikali għat} - \text{test})} \times 100$$

jew

$$\% \text{ degradation} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikali għat} - \text{test})}{\text{COD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikali għat} - \text{test})} \times 100$$

Għandu jkun innotat li dawn iż-żewġ metodi mhux neċessarjament jagħtu l-istess valur, huwa preferibbli li jsir użu mill-metodu preċedenti.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom in-nitroġenu, għamel użu mill-ThOD xieraq (NH_4 jew NO_3) skon ma jkun magħruf jew mistenni dwar l-okkorrenza tan-nitrifikazzjoni (l-Anness II.2). Jekk in-nitrifikazzjoni isseħħ imma ma tkun kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

VI.3.2. **Validità tar-riżultati**

L-eżawriment ta' l-ossiġenu mill-imbjank ta' l-inoculum m'għandux jeċċedi 1,5 mg ossiġenu mdewwb/litru wara 28 jum. Valuri għola minn dan jeħtieġu investigazzjoni tat-tekniki sperimental. Il-konċentrazzjoni residwa ta' l-ossiġenu fil-fliexken tat-test m'għandhiex tinżel għal anqas minn 0,5 mg/litru fi kwalunkwe żmien. Livelli hekk baxxi ta' l-ossiġenu huma validi biss jekk il-metodu għad-determinazzjoni ta; l-ossiġenu mdewweb tkun tista tkejjel tali livella bl-akbar eżatezza.

Ara wkoll I.5.2.

VI.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

VI.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

   Isem:

   Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru

   Konċentrazzjoni inizjali fil-flixkun: mg/litru

   ThOD jew COD: mg O_2/mg sustanza tat-test

4. **INOCULUM**

   Sorsi:

   Trattament mogħti:

▼B

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/litru

5. **DETERMINAZZJONI DO**

Metodu: Winkler/elettrodu

L-analiżi tal-garafini

Iż-żmien ta' l-inkubazzjoni (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Imbjank (mingħajr kimika)	1	C_1				
	2	C_2				
Medja	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Kimika tat-test	1	a_1				
	2	a_2				
Medja	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Nota: Formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kompost tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

6. **KORREZZJONI GĦAN-NITRIFIKAZZJONI** (ara l-Anness V)

Iż-żmien ta' l-inkubazzjoni (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)				
(ii)	Tibdil tal-konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)	—			
(iii)	Ossiġenu ekwivalenti (mg/litru)	—			
(iv)	Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)				
(v)	Tibdil tal-konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)	—			
(vi)	Ossiġenu ekwivalenti (mg/litru)	—			
(iii + vi)	Ossiġenu totali ekwivalenti (mg/litru)	—			

7. **EŻAWRIMENT DO: % DEGRADAZZJONI**

	Degradazzjoni wara jiem n (mg/litru)			
	n_1	n_2	n_3	
GARAFINA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
GARAFINA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Degradazzjoni wara jiem n (mg/litru)			
	n_1	n_2	n_3	
GARAFINA 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konk tat} - \text{test ThOD kemikali}}$				
GARAFINA 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konk tat} - \text{test ThOD kemikaliof test} \times \text{ThOD chemical}}$				
$\%\ D\ \text{medja}\ (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) bhala kondizzjoni stabbli(medja)

m_{to} = alur fil-garafina tat-test fil-ħin 0

m_{tx} = alur fil-garafina tat-test fil-ħin x

m_{bo} = l-valur medju ta' imbjank fil-ħin 0

m_{bx} = il-valur medju ta' imbjank fil-ħin x

Applika wkoll il-korrezzjoni għan-nitrifikazzjoni minn iii+vi fis-sezzjoni 6.

8. **EŻAWRIMENT DO IMBJANK**

Konsum ta' l-ossiġenu fl-imbjank: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/litru Dan il-konsum huwa importanti għall-validità tat-test. Dan għandu jkun anqas minn 1,5 mg/litru.

PARTI VII. **TEST M.I.T.I.** (Metodu ^{o}C.4-F)

VII.1. PRINĊIPJUTAL-METODU

It-teħid ta' l-ossiġenu bit-taħlita mħawda, jew bis-sospensjoni, tal-kimika tat-test f'medja minerali, inokulata b'mikro-organiżmi speċjalment imkabbra, mhux adattati, hija mkejla awtomatikament matul perijodu ta' 28 jum f'respirometri magħluq u fid-dlam fi 25 ± 1 ^{o}C. Id-disossidu tal-karbonju evolut huwa assorbit bil-ġir tas-soda. Il-biodegradabbiltà hija espressa bħala persentaġġ tat-teħid ta' l-ossiġenu (ikkorreġut għat-teħit fl-imbjank) tat-teħid teoretiku (ThOD). Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, u fl-aħħar mill-aħħar il-biodegredazzjoni bl-analiżi DOC.

VII.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

VII.2.1. **Apparat**

a) Arloġġ BOD elettroliku awtomatiku jew respirometru normalment mgħammar b'6 fliexken, 300 ml il-wieħed, u mgħammar b'kikkri sabiex ikun fihom l-assorbent CO_2;

▼B

b) Kamra ta' temperatura kostanti u/jew banju ta' l-ilma fi 25 °C ± 1 °C jew aħjar;

ċ) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);

d) analiżattur tal-karbonju (voluntarju).

VII.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Ipprepara t-taħlitiet bil-lest li ġejjin, bl-użu ta' reaġenti ta' grad analitiku u l-ilma (I.6.1.):

a) Monopotassium dihydrogen ortho phosphate, KH_2PO_4 — 8,50 g

Dipotassium monohydrogen ortho phosphate, K_2HPO_4 — 21,75 g

Disodium monohydrogen ortho phosphate dodecahydrate Na_2HPO_4 12 H_2O — 44,60 g

Klorid ta' l-ammonium, NH_4Cl — 1,70 g

Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.

Il-valur pH tat-taħlita għandu jkun 7,2

b) Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $MgSO_4$ 7 H_2O — 22,50 g

Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru

c) Klorid tal-kalċji, anidriju, $CaCl_2$ — 27,50 g

Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.

d) Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, $FeCl_3$ 6 H_2O — 0,25 g

Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.

Ħu 3 ml ta' kull taħlita (a), (b), (c) u (d) u wassal sa litru.

VII.2.3. **Preparazzjoni ta' l-inoculum**

Iġbor kampjuni friski minn mhux anqas minn għaxar siti, l-aktar minn żoni ta' fejn varjetà ta' kimiċi huma użati u mormija. Minn siti bħalma huma l-impjanti tat-trattament tad-drenaġġ, trattament ta' l-iskart industrijali, xmajjar, għadajjer, ibħra, iġbor litru tal-kampjun u tal-ħama', ħamrija tal-wiċċ, ilma, eċċ., u ħallat sewwa flimien. Wara li tneħħi l-materja li jkun hemm fil-wiċċ u tħalli li joqgħod, aġġusta s-supernatant għal pH 7 ± 1 bl-idrossidu tas-sodju u l-aċidu fosforiku.

Uża l-volum xieraq mas-supernayant iffiltrat sabiex timla reċipjent tal-“mili u ġbir” tal-ħama' attivata u agħti l-arja lil-likwidu għal madwar 231/2 siegħat. Tletin minuta wara li tkun waqfet l-arjazzjoni, warrab madwar terż tal-volum kollu tas-supernatant u żid volum egwali tat-taħlita (pH 7) li jkun fiha 0,1 % kull wieħed tal-glukożju, peptun, u monoputassa orto fosfat, mal-materja li tkun qagħdet u erġa ibda bl-arjazzjoni. Irrepeti din il-proċedura darba kuljum. L-unità tal-ħama' għandha tkun operata skond il-prattika tajba: l-effluwenti għandhom ikunu ċari, t-temperatura għandha tinżamm fi 25 ± 2 C, il-pH għandu jkun 7 ± 1, il-ħama' għandha tkun qagħdet sewwa, b'arjazzjoni suffiċjenti sabiex iżżomm it-taħlita erobika matul il-ħin kollu, il-protażoa għandha tkun preżenti u l-attività tal-ħama għandha tkun ittestjata kontra sustanza ta' referenza mill-anqas darba kull tlett xhur. Tutilizzax il-ħama' bħala inoculum sa mill-anqas xahar wieħed mill-operazzjoni, imma mhux aktar tard minn erba' xhur. Minn hemm 'il quddiem, iġbor kampjun minn mill-anqas 10 siti matul intervelli regolari, darba kull tlett xhur.

▼B

Sabiex iżżomm kemm il-ħama' friska u dik antika fl-istess attività, ħawwad is-supernatant iffiltrat ta' ħama' attivata bl-użu ta' volum egwali tas-supernatant iffiltrat mat-taħlita ta' l-għaxar sorsi miġbura friski u wettaq il-kultura ta' dak il-likwir miġmugħ kif deskritt hawn fuq. Iġbor il-ħama' għall-użu bħala inoculum 18-24 siegħa wara liu l-unita tkun ġiet mimlija.

VII.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Ipprepara dawn is-sitt garafini kif ġejjin:

Nru. 1: kimika tat-test f'ilma mdewweb fi 100 mg/litru

Nru. 2, 3 u 4: kimika tat-test f'minerali mdewweb fi 100 mg/litru

Nru. 5: kimika tat-test (eż. analin) f'medja minerali mdewwba fi 100 mg/litru

Nru. 6: medja minerali biss

Żid il-kimika tat-test li ma tantx tinħall fuq il-bażi ta' piż jew volum jew ittratta kif deskritt fl-Anness III, apparti li la s-solventi u l-anqas l-aġenti emulsifikanti m'għandhom ikunu wżati. Żid l-assorbent tal-CO2 mal-garafini kollha fil-kikkri speċjali kif fornuti. Aġġusta l-pH fil-garafini nri. 2, 3 u 4 għal 7,0.

VII.2.5. **It-twettieq tat-test**

Inokulta l-garafini nri. 2, 3 u 4 (sospensjoni tat-test, nru. 5 (kontroll ta' l-attività) u nru. 6 (inoculum fl-imbjank) b'volum żghir ta' l-inoculum sabiex ikun hemm konċentrazzjoni ta' 30 mg/litru ta' solidi sospiżi. Inoculum N huwa miżjud mal-garafina nru. 1 li sservi bħala kontroll abjotiku. Ħejji l-apparat, qabbad il-ħawwadi u ivverifika li ma tgħaddix arja, u ibda bil-kejl tat-teħid ta' l-ossiġenu taħt kondizzjonijiet fid-dlam. Ivverifika ta' kuljum, it-temperatura, l-ħawwadi u r-reġistratur kowlometriku tat-teħid ta' l-ossiġenu, u innota xi kambjamenti fil-kulur tal-kontenuti tal-garafini. Aqra l-akkwist ta' l-ossiġenu għas-sitt garafini direttament bil-metodu xieraq, per eżempju, mill-grafika tar-reġistrazzjoni ta' sitt punti, li tipproduċi kurva BOD. Fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, normalment 28 jum, kejjel il-pH tal-kontenuti tal-garafini u iddetermina l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test residwa u xi intermedju u, fil-każ ta' sustanza li tinħall fl-ilma, il-konċentrazzjoni ta' DOC (l-Anness II.4). Agħti attenzjoni speċjali fil-każ ta' kimika volatili. Jekk nitrifikazzjoni tkun antiċipata, iddetermina l-konċentrazzjoni tan-nitrat u tan-nitrit, jekk dan ikun possibbli.

VII.3. DATA URAPPORTAĠĠ

VII.3.1. **Trattament tar-riżultati**

Iddividi l-akkwista ta' l-ossiġenu (mg) tal-kimika tat-test wara ħin pre-determina (korreġut għal dak ta' l-inoculum tal-kontroll fl-imbjank wara l-istess ħin) bil-piż tat-kimika tat-test kif użata. Dan iforni il-BOD espress bħala mg ossiġenu/mg kimika tat-test, jiġifieri

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ teħid bil} - \text{kimika tat} - \text{ test} - \text{mg } O_2 \text{ teħid bl} - \text{imbjank})}{(\text{mg kimika tat } - \text{test fil} - \text{garafina})}$$

mg O_2 per mg tal-kimika tat-test

▼B

Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni huwa imbagħad akkwistat minn:

$$\%\ \text{biodegradazzjoni} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kimika})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kimika})} \times 100\%$$

Għat-taħlitiet, ikkalkola il-ThOD mill-analiżi elementali, bħal fil-każ ta' kompost sempliċi. Uża il-ThOD ($ThOD_{NH4}$ jew $ThOD_{NO3}$) xierqa skond ta' jekk in-nitrifikazzjoni tkunx assenti jew kompluta (l-Anness II.2). Jekk b'danakollu, n-nitrifikazzjoni isseħħ imma ma tkunx kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

Ikkalkola l-persentaġġ tal-biodegredazzjoni primarja mit-telf ta' kimika speċifika (paterna) (ara I.7,2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Jekk issib li kien hemm xi telf tal-kimika tat-test fil-garafina nru. 1, kejjel it-tneħħija fiżiku-kimika, agħmel rapport dwar dan u uża l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test (S_b) wara 28 jum f din il-garafina sabiex tikkalkola l-persentaġġ tal-biodegredazzjoni.

Meta jsiru d-determinazzjonijiet ta' DOC (voluntarji), ikkalkola il-persentaġġ aħħari tal-biodegredazzjoni, minn:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

kif deskritt taħt il-punt I.7.1. Jekk issib li kien hemm xi telf tal-DOC fil-garafina nru. 1, kejjel it-tneħħija fiżiku-kimika, uża l-konċentrazzjoni DOC fdin il-garafina sabiex tikkalkola l-persentaġġ tal-biodegredazzjoni.

Irreġistra r-riżultati kollha dwara id-data fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

VII.3.2. **Validità tar-riżultati**

It-teħid ta' l-ossiġenu ta' l-inoculum fl-imbjank normalment huwa 20-30 mg O_2/litru u m'għandux ikun aktar minn 60 mg/litru fi 28 jum. Valuri għola minn 60 mg/litru jkunu jeħtieġu eżaminazzjoni kritika tad-data u tat-tekniki sperimentali. Jekk il-valur tal-pH huwa 'l barra mill-medda 6-8,5 u l-konsum ta' l-ossiġenu bil-kimika tat-test huwa anqas minn 60 %, it-test għandu jkun repetut b'konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test.

Ara wkoll I.5.2.

Jekk il-presentaġġ tad-degradazzjoni ta' l-anilin ikkalkolat mill-konsum ta' l-ossiġenu ma jkunx jeċċedi 40 % wara 7 tijiet u 65 % wara 14-il jum, it-test ikun meqjus bħala invalidu.

VII.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

VII.4. FOLJATAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti hawn taħt.

TEST MITI (1)

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

▼B

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/l bħala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, C_o: mg/l bħala kimika

Volum tat-taħlita ta' reazzjoni, V: ml

ThOD: mg O_2/l

4. **INOCULUM**

Siti tal-kampjunar tal-ħama':

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Konċentrazzjonijiet ta' solidi sospiżi fil-ħama' attivata wara l-akklamitizzazzjoni bid-drenaġġ sintetiku +… mg/litru

Volum tal-ħama' attivata kull litru tal-medja finali =… ml

Konċentrazzjoni tal-ħama' fil-medja finali =… mg/litru

5. **TEĦID TA' L-OSSIĠENU BIODEGRADABBILITÀ**

Tip ta' respirometru użat:

			(jum)				
			0	7	14	21	28
O_2 upt. (mg), kimika tat-test	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 upt. (mg), imbjank	b						
Ikkorreġut O_2 upt. (mg)	(a_1 - b) (a_2 - b) (a_3 - b)						
BOD kull mg tal-kimika tat-test	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Garafina 1.					
		Garafina 2.					
		Garafina 3.					
% degradazzjoni $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		medja (*)					

(*) bħala kondizzjoni stabbli(medja).

▼B

Nota: Formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kompost ta' referenza.

6. **ANALIŻI TAL-KARBONJU** (voluntarju)**:**

Analizzatur tal-karbonju:

Garafina	DOC				% DOC imneħħi	Medja
	Imkejjel		Ikkorreġut			
Ilma + sustanza tat-test	a				—	—
Ilma + sustanza tat-test	b_1		b1 – c			
Ilma + sustanza tat-test	b_2		b_2 – c			
Ilma + sustanza tat-test	b_3		b_3 – c			
Kontroll fl-imbjank	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC imneħħi} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA SPECIFIKA KUMIKA ANALITIKA**

	Ammont residwu tal-kimika tat-test fit-tmiem tat-test	% degradazzjoni
Test imbjank bl-ilma	S_b	
meda inokulata	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ degradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Ikkalkola il- % tad-degradazzjoni għall-garafini a1, a2 u a3 rispettivament

8. **RIMARKI**

Il-kurva BOD kontra l-ħin, jekk disponibbli, għandha tkun mehmuża.

▼B

ANNESS I

ABBREVJAZZJONIJIET U DEFINIZZJONIJIET

DO: Ossiġenu mdewweb (mg/l) hija l-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb f'kampjun akweju.

BOD: Talba biokimika ta' l-ossiġenu (g) hija l-ammont ta' l-ossiġenu ikkunsmat mill-mikro-organiżmi meta ssir il-metabolizzazzjoni tal-kompost tat-test; espress wkoll bħala g teħid ta' l-ossiġenu kull g tal-kompost tat-test. (ara l-metodu C.5).

COD: Talba ta' l-ossiġenu Kimiku (g) hija l-ammont ta' orriġenu ikkunsmat matul l-assidizzazzjoni ta' kompost tat-test bl-aċidu dikromatiku jaħraq; din tipprovdi għall-ammont tal-materja ossidizzabbli preżenti; ukoll espressa bħala g ossiġenu ikkunsmat kull g tal-kompost tat-test. (ara l-metodu C.6).

DOC: Karbonju organiku mdewweb huwa l-karbonju organiku preżenti fit-taħlita jew li jgħaddi minn filtru ta' 0,45 mikrometri jew jibqa fis-supernatant wara ċ-ċentrifigazzjoni fi 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) għal 15-il minuta.

ThOD: Talba teoretika ta' l-ossiġenu (mg) hija l-ammont totali ta' l-ossiġenu meħtieġ għall-ossidizzazzjoni kompleta ta'kimika; hija ikkalkolata mill-formula molekulati (ara l-Anness II.2) u hija wkoll espress bħala mg ossiġenu meħtieġ kull mg tal-kompost tat-test.

$ThCO_2$: Diossidu karbonju teoretiku (mg) hija l-kwantita ta' diossidu tal-karbonju ikkalkolat li jkun prodott mill-kontenut tal-karbonju magħruf jew imkejjel tal-kompost tat-test meta kompletament mineralizzat, ukoll espress bħala mg diossidu tal-karbonju kull mg tal-kompost tat-test.

TOC: Karbonju organiku totali ta' kampjun huwa s-somma tal-karbonju organiku fit-taħlita u fissospenzjoni.

IC: Karbonju inorganiku

TC: Karbonju totali huwa s-somma tal-karbonju organiku u inorganiku preżenti f'kampjun.

Biodegredazzjoni primarja:

hija t-tibdil fl-istruttura kimika ta' sustanza, imwassla bl-azzjoni bjoloġika, li tirriżulta mit-telf ta' proprjetà speċifika ta' dik is-sustanza.

Biodegredazzjoni finalissima (erobika):

hija l-livell tad-degradazzjoni akkwistata meta l-kompost tat-test ikun totalment utilizzat bil-mokroorganiżmi li jirriżulta fil-produzzjoni tad-diossidu tal-karbonju, ilma, melħ minerali u kostitwenti ġodda mikrobjali ċellulari (biomassa).

Biodegrabbillità Pronta:

klassifikazzjoni arbitrarja tal-kimika li tkun għaddiet minn ċerti testijiet speċifiċi tal-għażla għall-biodegradabbilità finalissima; dawn it-testijiet huma hekk stringenti li huma assumiti li tali komposti jkunu malajr jew kompletament biodegradabbli f'ambjenti akweji permezz ta' kondizzjonijiet erobiċi.

▼B

Biodegrabbillità Inerenti:

klassifikazzjoni tal-kimika li dwarha jkun hemm evidenza mingħajr ekwivoku tal-biodegradazzjoni (primarja jew finalissima) fi kwalunkwe test rikonoxxut tal-biodegradabbilità.

Trattabbilità:

hija l-amenabbilità ta' komposti għat-tneħħija matul it-trattament bioloġiku ta' l-ilma ta' l-iskart mingħajr ma tkun affettwata b'mod ħażin l-operazzjoni normali tal-proċessi tat-trattament. Ġeneralment, komposti faċilment biodegradabbli jistgħu jkunu trattati, imma mhux il-komposti ineretament biodegradabbli huma hekk. Proċessi abjotiċi jistgħu ukoll ikunu operabbli.

L-ispazju

taż-żmien mill-innokulazzjoni, fit-test tat-tneħħija bil-kulur, sal-persentaġġ tad-degradazzjoni, jkun żdied b'mill anqas 10 %. L-ispazju taż-żmien huwa ta' spiss varjabbli u riproduċibbli ħażin ħafna.

Il-ħin tad-degradazzjoni

huwa l-ħin mit-tmiem ta' l-ispazju tal-ħin sal-ħin li 90 % tal-livell massimu tad-degradazzjoni tkun ġiet milħuqha.

Il-perijodu ta' 10 ijiem

huma l-10 jiem li immedjetament isegwu l-akkwist ta' l-10 % degradazzjoni.

▼B

ANNESS II

KALKOLU U DETERMINAZZJONI TA' PARAMETRI SOMMARJI XIERQA

Jiddependi mill-metodu magħżul, ċerti parametri sommarji jkunu meħtieġa. Is-sezzjoni li ġejja tiddeskrivi dderiva ta' dawn il-valuri. L-użu ta' dawn il-parametri hija deskritta fil-metodi individwali.

1. **Kontenut tal-Karbonju**

Il-kontenut tal-karbonju huwa ikkalkolat minn komposizzjoni elementali magħrufa jew determinata bl-analiżi elementali tas-sustanza tat-test.

2. **ThOD = Theoretical Oxygen Demand (Talba teoretika ta' l-ossiġenu)**

It-Talba teoretika ta' l-ossiġenu (ThOD) tista tkun ikkalkolata jekk il-komposizzjoni elementali tkun magħrufa jew determinata b'analiżi elementali. Hija għal kompost:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

mingħajr nitrifikazzjoni,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\,[2\,c + 1/2(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

jew bin-nitrifikazzjoni,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\,[2\,c + 1/2(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Talba ta' l-Ossiġenu Kimiku (COD)**

It-Talba ta' l-Ossiġenu Kimiku (COD) hija determinata skond il-metodu C.6.

4. **DOC = Dissolved Organic Carbon (Karbonju organiku mdewweb)**

Il-Karbonju organiku mdewweb (DOC) huwa bid-definizzjoni l-karbonju organiku ta' kwalunkwe kimika jew taħlita fl-ilma li tgħaddi minn filtru 0,45 mikrometri.

Kampjuni mir-reċipjenti tat-test huma miġbura u iffiltrati immedjatament minn apparat tal-filtrazzjoni blużu ta' membrana filtranti xierqa. L-ewwel 20 ml (l-ammont jista jkun imnaqqas meta jsir użu minn filtranti żgħar) tal-filtrat ikunu mwarrba. Volumi ta' 10-20 ml jew anqas, jekk injettati (il-volum jiddependi mill-ammont meħtieġ għall-analizzatur tal-karbonju) huma miżmuma għall-analizzar tal-karbonju. Il-konċentrazzjoni DOC hija determinata permezz ta' l-analizzatur tal-karbonju organiku li huwa kapaċi li jkejjel b'eżatezza l-konċentrazzjoni tal-karbonju ekwivalenti għal, jew aktar baxxa minn 10 % tal-konċentrazzjoni DOC inizjali użat fittest.

Kampjuni iffiltrati li ma jkunux jistgħu jiġu analizzati fl-istess jum utili jistgħu ikunu preservati bil-ħażna fir-refriġeratur fi 2-4 °C għal 48 h, jew f'anqas minn 18 °C għal perijodu twil.

Rimarki:

Filtri tal-membra huma ta' spiss impregnati b'surfaktanti għall-idrofilizzazzjoni. B'hekk il-filtru jista jkun fih sa diversi mg ta' karbonju organiku solubbli li jkun jinterferixxi fid-determinazzjonijiet tal-biodegradabbilità. Surfaktanti u komposti organiċi solubbli oħrajn huma mneħħija mill-filtri billi jkunu mogħllija f'ilma dejonizzat għal tlett perijodi ta' siegħa kull wieħed. Il-filtri jistgħu mbagħad ikunu maħżuna fl-ilma għal ġimgħa waħda. Jekk ikunu wżati l-kartuċċi tal-filtri, kull lott għandu jkun ivverifikat dwar il-konformità li dan ma jkunx jirrilaxxa karbonju organiku li jinħall.

▼B

Jiddependi mit-tip tal-filtri tal-membrana, l-kimika tat-test tista' tkun miżmuma bl-assorbazzjoni. Jista jkunġhalhekk rakkomandabbli li jkun assigurat li l-kimika tat-test ma tkunx miżmuma bil-filtru.

Centrifugazzjoni fi 40 000 m.sek 2 (4 000 g) għal 15-il minuta tista tkun użata għad-differenzazzjoni ta' TOC versus DOC minflok il-filtrazzjoni. Il-metodu mhux affidabbli fil-konċentrazzjoni inizjali ta' < 10 mg DOC/l ladarba jew mhux il-bakterja kollha tkun imneħħija jew inkella l-karbonju bħala parti tal-bakterja, plażma tkun imdewba mill-ġdid.

BIBLJOGRAFIJA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat.Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs-und StoffkenngroLen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschu1 Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1),169.

▼B

ANNESS III

EVALWAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ TA' SUSTANZI LI FTIT LI XEJN JINĦALLU

Fit-testijiet tal-biodegradabbilità b'sustanzi li ftit li xejn jinħallu, l-aspetti li ġejjin għandhom jirċievu attenzjoni speċjali.

Waqt li l-likwidi omoġenji rari jippreżentaw problemi tal-kampjunar, huwa rakkommandabbli li materjali solidi jkunu omoġenizzati bil-mezzi xierqa sabiex ikunu evitati żbalji minħabba n-nuqqa ta' omoġenità.

Attenzjoni speċjali għandha tkun mogħtija meta kampjuni rappreżentattivi ta' ftit milligrammi huma meħtieġa minn taħlitiet ta' kimika jew sustanzi b'ammonti żgħar ta' impuritajiet. Diversi għamliet ta' aġitazzjoni matul it-testijiet tista tkun użata. Attanzjoni għandha tingħata għall-użu biss ta' aġitazzjoni suffiċjenti sabiex il-kimika tinżamm imxerda, u sabiex ikunu evitati sħana żejda, rgħawwa eċċessiva u forzi qawwija eċċessivi.

Jista jkun użat emulsifikatur li jagħti tixrid stabbli tal-kimika. Dan m'għandux ikun tossiku għall-bakterja u m'għandux ikun biodegradabbli jew li joħloq ir-rgħawwa bil-kondizzjonijiet tat-test.

L-istess kriterja hija applikabbli għal solventi bħalma hija applikabbli għall-emulsifikanti.

Mhux rakkomandat li trasportaturi solidi jkunu wżati għal sustanzi solidi tat-test imma dawn jistgħu ikunu adatti għal sustanzi żejtnija.

Meta sustanzi awżiljarji bħalma huma l-emulsifikanti, solventi u trasportaturi jkunu wżati, prova fl-imbjank li jkun fiha s-sustanza awżiljarja, għandha tkun imwettqa.

Kwalunkwe mit-tlett testijiet respirometriċi $C0_2$, BOD, MITI jistgħu ikunu wżati fl-istudju tal-biodebradabbilità tal-komposti li ftit li xejn jinħallu.

BIBLJOGRAFIJA

— de Morsier, A. et al., *Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere,* 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., *The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere*, 1984, vol. 13, 169.

▼B

ANNESS IV

EVALWAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ TA' KIMIKA SUSPETTATA LI TKUN TOSSIKA GĦALL-INOCULUM

Meta kimika hija suġġetta għal testijiet ta' biodegradabbilità faċli u tidher li ma tkunx biodegradabbli, l-proċedura li ġejja hija rakommandabbli jew distinzjoni bejn l-inibizzjoni u l-inenità tkun mixtieqa (Reynolds et al., 1987).

Inocula simili jew identika għandha tkun użata għat-testijiet tat-tossiċità u l-biodegredazzjoni.

Sabiex tkun assessjata t-tossiċità tal-kimika studjata f'testijiet tal-biodegradibbiltà faċli, l-applikazzjoni ta' ġemgħa waħda ta' l-inibizzjoni tar-rata tar-Respirazzjoni tal-Ħama' (test ta' l-inibizzjoni tar-respirazzjoni talħama attivata – Dir 88/302/EEC), BOD u/jew il-metodi ta' l-Inibizzjoni tat-Tkabbir, għandhom ikunu jidħru jidhru xierqa.

Jekk l-inibizzjoni minħabba t-tossiċità għandha tkun evitata, huwa suġġerit li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test użata fit-testijiet tal-biodegradabbiltà faċli għandha tkun mhux anqas minn 1/10 tal-valuri EC_{50} (jew anqas mill-valuri EC_{20}) akkwistati fit-testijiet tat-tossiċità. Komposti b'valur EC_{50} jew akbar minn 300 mg/l aktarx li ma jkollhomx effetti tossiċi fit-testijiet tal-biodehradabbiltà faċli.

Il-valuri EC_{50} ta;' anqas minn 20 mg/l huma aktarx li jimponu problemi serji għal testijiet sussegwenti. Konċentrazzjoni tat-test baxxi għandhom ikunu użati, li joħolqu l-ħtiega ta' l-użu tat-test stringenti u sensittiv tal-Flixkun Magħluq jew l-użu ta' 14C – materjal bit-tikketta. B'mod alternattiv, *inoculum* akklamitizzat jista jippermetti li jkunu użati konċentrazzjonijiet ogħla tas-sustanza tat-test. F'dan il-każ ta' l-aħħar, b'danakollu, l-kriterja speċifika tat-test tal-biodegradabbilità faċli li tintilef.

BIBLJOGRAFIJA

Reynolds, L. et al., *Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability*. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

ANNESS V

KORREZZJONI TAT-TEĦID TA' L-OSSIĠENU GĦALL-INTERFERENZA BIN-NITRIFIKAZZJONI

Żbalji minħabba li ma tkunx ikkonsidrata n-nitrifikazzjoni fil-kalkolazzjoni tat-teħid ta' l-ossiġenu bilbiodegradabbilità tas-sustanzi tat-test li ma jkun fihom N huma marġinali (mhux akbar minn 5 %), anki jekk l-ossidazzjoni ta' l-ammonju-N fil-medja isseħħ b'mod erratiku bħal bejn ir-reċipjenti tat-test u l-imbjank. B'danakollu, għal sustanzi tat-test li jkun fihom N, żbalji serji jistgħu iseħħu.

Jekk in-nitrifikazzjoni tkun seħħet imma ma tkunx kompluta, t-teħid osservat ta' l-ossiġenu bit-taħlita tarreazzjoni jista' jkun ikkoerruġut għall-ammont ta' l-ossiġenu użat fl-ammonju ossidizzanti għan-nitrit u nnitrat, jekk il-bidliet fil-konċentrazzjoni matul l-inkubazzjoni tan-nitrit u n-nitrat huma determinati bilkonsiderazzjoni ta' dawn l-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_2 + 2\ HCI + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Globalment:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Mill-ekwazzjoni (1), l-akkwist ta' l-ossiġenu bit-28 g ta' nitroġenu li jkun jinsab fil-klorid ta' l-ammonium (BH_4C1) li jkun ossidizzat għan-nitrit huwa 96 g, i.e. fattur ta' 3,43 (96/28). Bl-istess mod, mill-ekwazzjoni (3), l-akkwist ta' l-ossiġenu bit-28 g ta' nitroġenu li jkun ossidizzat għan-nitrit huwa 128 g, i.e. fattur ta' 4,57 (128/28).

Ladarba r-reazzjonijiet huma sekwenzali, li jkunu esegwiti minn speċje ta' bakterja distinta u differenti, huwa possibbli għall-konċentrazzjoni tan-nitrit li tiżdied jew tonqos; f'dan il-każ ta' laħħar, konċentrazzjoni ekwivalenti tan-nitrat ikun iffurmat. Għalhekk, l-ossiġenu ikkunsmat fil-formazzjoni ta' ornitrat hija 4,75 multiplikata biż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat, filwaqt li l-ossiġenu assoċjaat mal-formazzjoni tan-nitri hija 3,43 multiplikata biż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrit jew bit-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tagħha, ittelf ta' l-ossiġenu huwa - 3,43 moltiplikat bit-tnaqqis fil-konċentrazzjoni.

Dan ifisser:

0_2 ikkunsmat fil-formazzjoni tan-nitrat = 4,57 × iż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat (4)

u

0_2 ikkunsmat fil-formazzjoni tan-nitrit = 3,43 × iż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrit (5)

u

0_2 mitluf fl-għebien tan-nitrit = - 3,43 × it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tan-nitrat (6)

Sabiex

0_2 akkwistat minħabba n-nitrifikazzjoni = ± 3,43 × il-kambjament fin-nitrit ikkonċentrat + 4,57 ×i żida fin-nitrat ikkonċentrat. (7)

u għalhekk

0_2 akkwistat minħabba l-ossidizzazzjoni C = l-akkwist totali osservat – l-akkwist minħabba nnitrifikazzjoni (8)

B'mod alternattiv, jekk it-total biss ta' l-N ossidizzat huwa determinat, l-akkwista ta' l-ossiġenu minħabba nnitrifikazzjonijista' jkun meqjus bħala, fl-ewwel approssimazzjoni, 4,57 × iż-żieda fl-N ossidizzat.

Il-valur ikkorreġut għall-konsum ta' l-ossiġenu minħabba l-ossidizzazzjoni ta' C huwa mbagħad imqabbel mal- ThOD NH_3, kif ikkalkolat fl-Anness II.

▼B

C.5. **DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU BIOKEMIKALI**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop tal-metodu huwa l-kejl tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali (BOD) ta' sustanzi organiċi solidi u likwidi.

L-informazzjoni elaborata b'dan it-test tappartjeni għal komposti li jinħallu fl-ilmal b'dana kollu, komposti volatili u dawk b'solubbiltà baxxa fl-ilma jistgħu wkoll, għall-anqas fil-prinċipju, jkunu ittestjati.

Il-metodu huwa applikabbli biss għal dawk il-materja organiċi tat-test li ma humiex inibitorji għall-bakterja fil-konċentrazzjoni użata fit-test. Jekk il-materjal tat-test ma jkunx jinħall fil-konċentrazzjoni tat-test, miżuri speċjali, bħalma hu l-użu ta' dispersjoni ultrasonika, jistgħu jkunu wżati sabiex tkun akkwistata dispersjoni tajba tal-materjal tat-test.

Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika tista tkun utili għall-interpretazzjoni ta' riżultati baxxi u fil-għażla tal-konċentrazzjonijiet xierqa tat-test.

1.2. DEFINIZZJONI U UNITAJIET

Il-BOD huwa definit bħala l-massa ta' ossiġenu mdewweb meħtieġ minn volum speċifikat tat-taħlita tas-sustanza għall-proċess ta' l-ossidizzazzjoni biokimika skond il-kondizzjonijiet preskritti.

Dawn ir-riżultati huma espressi bħala grammi tal-BOD f'kull gramma tas-sustanza ittestjata.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

L-użu ta' sustanza ta' referenza xierqa għall-verifika ta' l-attività ta' l-inoculum hija mixtieqa.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Ammont predominanti tas-sustanza, mdewweb jew imxerred b'medja adatta sew-arjata, huwa innokulat mal-mikro-organiżmi u inkubat f'temperatura kostanti ambjenti definita, f'post fid-dlam.

Il-BOD huwa determinat bid-differenza tal-kontenut ta' l-ossiġenu mdewweb fil-bidu u fit-tmien tat-test. It-tul ta' żmien tat-test għandu jkun mill-anqas ħamest ijiem u mhux aktaar minn 28 jum.

Imbjank għandu jkun determinat f'assaġġ parallel li ma jkun fih l-ebda sustanza tat-test.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Id-determinazzjoni BOD ma tistgħax tkun meqjusa bħala determinazzjoni valida tal-biodegradabbiltà ta' sustanza. Dan it-test jista biss ikun meqjus bħala test ta' prova.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Taħlita jew tixrid preliminari tas-sustanza huwa ippreparat sabiex tkun akkwista l-konċentrazzjoni BOD kompatibbli mal-metodu użat. Il-BOD huwa mbagħad determinat skond kwalunkwe metodu standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

▼B

2. **DATA U EVALWAZZJONI**

Il-BOD li jkun jinsab fit-taħlita preliminari huwa kalkolat skond il-metodu normalizzat magħżul, u konvertit fi grammi ta' BOD kull gramma tas-sustanza tat-test.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Il-metodu użat għandu jkun mistqarr.

It-talba għall-ossiġenu biokemikali għandha tkun il-medja ta' mill-anqas tlett kejl validi.

L-informazzjoni u r-rimarki kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu irrappurtati, speċjalment f'dak li jirrigwardja l-impuritajiet, l-istat fiżiku, l-effetti tossiċi u l-komposizzjoni inerenti tas-sustanza.li jkunu jaffettwaw ir-riżultati.

L-użu ta' addittiv għall-inibizzjoni tan-nitrifikazzjoni bioloġika għandu jkun irrappurtat.

4. REFERENZI

Lista ta' metodi standardizzati, per eżempju:

NF T 90-103: Determinazzjoni tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali.

NBN 407: Talba ta' l-ossiġenu biokemikali.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

Id-determinazzjoni tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali, il-Metodu S għall-eżaminazzjoni ta' l-ilma u l-materjali assoċjati, HMSO, Londra.

ISO 5815: Determinazzjoni tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali wara n jiem.

▼B

C.6. **DEGRADAZZJONI — TALBA TA' L-OSSIĠENU KEMIKALI**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop tal-metodu huwa l-kejl tat-talba ta' l-ossiġenu kemikali (COD) ta' sustanzi organiċi solidi u likwidi f'manjera normali, arbitrarja, skond kondizzjonijiet fissi tal-laboratorju.

Informazzjoni dwar il-formula tas-sustanza tkun utili għat-twettieq tat-test u l-interpretazzjoni tar-riżultat akkwistat (eż. imluħa aloġenizzati, imluħa ferrużi ta' komposti organiċi, komposti organoklorini).

1.2. DEFINIZZJONIJIET U U NITAJIET

It-talba ta' l-ossiġenu kemikali hija l-kejl ta' l-ossidabbilità ta' sustanza, espressa fl-ammont ekwivalenti ta' ossiġenu ta' reaġent ossidizzanti ikkunsmat mis-sustanza skond kondizzjonijiet fiss-tal-laboratorju.

Ir-riżultat huwa espress bħala grammi tal-COD kull gramma tas-sustanza ittestjata.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza ma jeħtieġux li jkunu wżati fil-każi kollha meta tkun investigata sustanza ġdida. Dawn għandhom primarjament iservu għall-kalibrazzjoni tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu l-paragun mar-riżultati tal-metodu applikat.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Ammont predeterminat tas-sustanza, imdewba jew imxerda fl-ilma, huwa ossidizzat bid-dikromat tal-putass f'medja qawwija ta' l-aċidu sulfuriku bis-sulfat tal-fidda bħala katalist, taħt reflus għal sagħtejn. Id-dikromat residwu huwa determinat bit-titrazzjoni mas-sulfat ta' l-ammonium ferruż standardizzat.

Fil-każ ta' sustanzi li jkun fihom il-klorin ([1]), sulfat tal-merkurju huwa miżjud sabiex titnaqqas l-interferenza tal-klorid.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Minħabba l-manjiera arbitrarja tad-determinazzjoni, il-COD huwa "indikatur ossidizzabbli" u bħala tali użat bħala metodu prattiku fil-kejl tal-materja organika.

Il-klorid jista jinterferixxi f'dan it-test, aġenti inorganiċi tat-tnaqqis jew ta' l-ossidizzazzjoni jistgħu ukoll jinterferixxu mad-determinazzjoni tal-COD.

Uħud mill-kompost ċikliċi u ħafna mis-sustanzi volaiti (eż. aċidi xaħmija baxxi) ma humiex kompletament ossidizzati b'dan it-test.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Taħlita jew tixrid preliminarji tas-sustanza huma ippreparati sabiex ikun akkwistat COD bejn 250 u 600 mg kull litru.

([1]) Wara l-użu, is-soluzzjonijiet li fihom *salts* tal-merkurju għandhom jiġu trattati sabiex jiġi evitat it-tixrid tal- merkurju fl-ambjent.Altrimentri l-BOD huwa mbagħad determinat skond kwalunkwe metodu xieraq standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

▼B

Rimarki:

Fil-każ ta' sustanza li ma tantx tinħall u mhux-dispersibbli, ammont ta' sustanza miġjuba trab fin jew sustanza likwida korrespondenti għal madwar S mg ta' COD tista tkun miżuna u poġġuta fl-apparat esperimentali bl-ilma.

It-talba ta' l-ossiġeni kemikali (COD) hija ta' spiss u speċjalment fil-każ ta' sustanzi li ma tantx jinħallu, determinata b'mod vantaġġuż ġewwa varjant tal-metodu, i.e., f'sistema magħluqa bl-ekwalizzatur tal-pressjoni (H. Kelkenberg, 1975). F'din il-modifika, l-komposti huma determinati biss b'diffikulta bil-metodu konvenzjonali. – eż. aċidu aċetiku – jista ta' spiss ikun kwantifikat b'suċċess. Il-metodu wkoll jonqos, b'dana kollu, fil-każ tal-pridin Jekk il-konċentrazzjoni tad-dikromat tal-putassa, kif preskritt fir-ref. (1), huma mtella għal 0,25 N (0,0416 M), l-użin direct ta' 5-10 mg tas-sustanza huwa faċilitat, li huwa essenzali għad-determinazzjoni tal-COD ta' sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma (ref. (2)).

Altrimenti l-BOD huwa mbagħad determinat skond kwalunkwe metodu xieraq standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

2. **DATA U EVALWAZZJONI**

Il-COD li jkun jinsab fil-garafina sperimentali huwa ikkalkolat skond il-metodu normalizzat magħżul, u ikkonvertit fi grammi ta' COD kull gramma tas-sustanza tat-test.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Il-metodu użat għandu jkun mistqarr.

It-talba għall-ossiġenu kemikali għandha tkun il-medja ta' mill-anqas tlett kejl validi. L-informazzjoni u r-rimarki kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu irrappurtati, speċjalment f'dak li jirrigwardja l-impuritajiet, l-istat fiżiku, l-effetti tossiċi u l-komposizzjoni inerenti tas-sustanza.li jkunu jaffetwaw ir-riżultati.

L-użu tas-sulfat tal-merkurju għal minimizzar ta' l-interferenza tal-klorid għandu jkun rapportat.

4. **REFERENZI**

(1) Kelkenberg, H.,Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Lista ta' metodi standardizzati, per eżempju:

NBN T 91-201 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossiġnu.

ISBN 0 11 7512494 Id-domanda kemikali ta' l-ossiġnu (il-valur tad-*dichromate*) ta' l-ilmijiet imniġġsa u *waste waters*.

NFT 90-101 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossiġnu.

DS 217 = L-analiżi ta' l-ilma Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossiġnu.

DIN 38409-H-41 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossiġnu (COD) fil-medda li tasal iktar minn 15 mg kull litru.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Kwalità ta' l-ilma: talba ta' l-ossiġenu kemikali metodi dikromati.

▼B

C.7. ID-DEGRADAZZJONI – ID-DEGRADAZZJONI ANTIBIJOTIKA: L-IDROLISI BĦALA FUNZJONI TAL-PH

1. METODU

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalenti għall-OECD TG 111 (2004).

1.1. DAĦLA

Il-kimiċi jistgħu jidħlu fl-ilmijiet tal-wiċċ b'tali metodi bħall-applikazzjoni diretta, l-irxiex, l-ilma li jiskula, id-drenaġġ, ir-rimi ta' l-iskart, l-effluwent industrijali, domestiku jew agrikolu u d-depożizzjoni atmosferika u jistgħu jiġu ttrasformati f'dawk l-ilmijiet minn proċessi kimiċi (eż. l-idrolisi, l-ossidazzjoni), fotokimiċi u/jew mikrobjali. Din il-Linja Gwida tiddeskrivi metodu tat-test fil-laboratorju biex jiġu stmati trasformazzjonijiet idrolitiċi abjotiċi tal-kimiċi f'sistemi akkwatiċi ta' valuri pH normalment misjuba fl-ambjent (pH 4 – 9) u hija bbażati fuq Linji Gwidi eżistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

L-esperimenti huma mwettqa sabiex jiġu ddeterminati (i) ir-rata ta' l-idrolisi tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-pH u (ii) l-identità jew in-natura u r-rati tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti ta' l-idrolisi li għalihom jistgħu jiġu esposti l-organiżmi. Dawn l-istudji jistgħu jkunu meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati għall-ilma jew li x'aktarx jilħqu l-ambjent b'mezzi oħrajn deskritti hawn fuq.

1.2. DEFINIZJONIJIET U UNITAJIET

Ara l-Anness 2

1.3. L-APPLIKABILITÀ TAL-METODU

Il-metodu ġeneralment jgħodd għal sustanzi kimiċi (mingħajr tikketta jew bit-tikketta) li għalihom huwa disponibbli metodu analitiku bi preċiżjoni u sensittività biżżejjed. Jgħodd għall-komposti ftit volatili u mhux volatili ta' solubbiltà suffiċjenti fl-ilma. It-test ma għandux jgħodd għall-kimiċi li huma volatili ħafna mill-ilma (eż. fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistax jinżamm fit-taħlita taħt il-kondizzjonijiet esperimentali ta' dan it-test. It-test jista' jkun diffiċli li jitwettaq b'sustanzi ta' solubbiltà minima fl-ilma (8).

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Taħlitiet *buffer* solubbli bl-ilma ta' valuri pH differenti (pH 4, 7 u 9) huma trattati bis-sustanza tat-test u inkubati fid-dlam taħt kondizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati (b'temperaturi kostanti). Wara intervalli xierqa ta' żmien, it-taħlitiet *buffer* huma analizzati għas-sustanza tat-test u għall-prodotti ta' l-idrolisi. Bis-sustanza tat-test ittikkettjat (eż. ^{14}C), jista' jiġi stabbilit bilanċ tal-massa b'mod aktar faċli.

Dan il-metodu tat-test huwa diżinjat bħala strateġija f'saffi li tintwera u hija spjegata fl-Anness 1, Kull saff huwa mibdi mir-riżultati tas-saff ta' qablu.

▼B

1.5. L-INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Is-sustanza tat-test mingħajr tikketta jew bit-tikketta tista' tintuża biex titkejjel ir-rata ta' l-idrolisi. Il-materjal ittikkettjat ġeneralment huwa preferut għall-istudju tar-rotta ta' l-idrolisi u biex jitwaqqaf il-bilanċ tal-massa; iżda, f'każijiet speċjali, l-ittikkettjar jista' ma jkunx assolutament neċessarju. L-ittikkettjar ta' ^{14}C huwa rrakkomandat iżda l-użu ta' iżotopi oħrajn bħal ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, jista' jkun utli wkoll. Sa fejn possibbli, it-tikketta għandha tkun pożizzjonata fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekula. Per eżempju, jekk is-sustanza tat-test fiha ċirku wieħed, it-tikkettjar fuq dan iċ-ċirku huwa meħtieġ; jekk is-sustanza tat-test fiha żewġ ċrieki jew aktar, jistgħu jkunu meħtieġa studji separati biex jiġi evalwat id-destin ta' kull ċirku ttikkettjat u biex jinkiseb l-informazzjoni xierqa dwar il-formazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi. Is-safa tas-sustanza tat-test għandha tkun mhux inqas minn 95 %.

Qabel ma jsir it-test ta' l-idrolisi, għandha tkun disponibbli din l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test:

a) is-solubbiltà fl-ilma [Il-Metodu tat-Test A.6];

b) is-solubbiltà fis-solventi organiċi;

ċ) il-pressa tal-fwar [Metodu tat-Test A.4] u/jew il-kostant tal-Liġi ta' Henry;

d) il-koeffiċjenti tal-qsim n-octanol/ilma [Il-Metodu tat-Test A.8];

e) il-kostant tad-dissoċjazzjoni (pK_a) [Linja Gwida 112 ta' l-OECD] (9);

f) rata ta' fototrasformazzjoni diretta u indiretta fl-ilma fejn xieraq.

Il-metodi analitiċi għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza tat-test u, jekk huwa rilevanti, għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi f'taħlitiet bl-ilma għandhom ikunu disponibbli (ara wkoll it-taqsima 1.7.2).

1.6. IS-SUSTANZI TA' RIFERENZA

Fejn possibbli, is-sustanzi ta' riferenza għandhom jintużaw għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi bil-metodi spettroskopiċi u kromatografiċi jew metodi oħrajn sensittivi b'mod xieraq.

1.7. IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ

1.7.1. **L-irkupru**

L-analiżi ta', għall-inqas, soluzzjonijiet *buffer* doppji jew ta' l-estratti tagħhom immedjatament wara ż-żjieda tas-sustanza tat-test tagħti l-ewwel indikazzjoni tar-repetibbiltà tal-metodu analitiku u ta' l-uniformità tal-proċedura ta' l-applikazzjoni għas-sustanza tat-test. L-irkupru għal stadji aktar tard ta' l-esperimenti jingħata bil-bilanċi tal-massa rispettivi (meta jintuża materjal ittikkettjat). L-irkupru għandu jvarja minn 90 % sa 110 % għal kimiċi ttikkettjati u mhux ittikkettjati (7). Fil-każ li huwa teknikament diffiċli li tintlaħaq din l-iskala, irkupru ta' 70 % għall-kimiċi mhux ittikkettjati, iżda għandha tingħata ġustifikazzjoni.

▼B

1.7.2. **Ir-repetibbiltà u s-sensittività tal-metodu analitiku**

Ir-repetibbiltà tal-metodu/i analitiku/iċi biex tiġi kkwantifikata s-sustanza tat-test u l-prodotti ta' l-idrolisi f'ħinijiet aktar tard tista' tiġi vverifikata bl-analiżi doppja ta' l-istess taħlitiet *buffer* (jew ta' l-estratti tagħhom) wara li biżżejjed kwantitajiet ta' prodotti ta' l-idroliġi jkunu ffurmaw għall-kwantifikazzjoni.

Il-metodu analitiku għandu jkun sensittiv biżżejjed biex il-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test jiġu kkwalifikati sa 10 % jew inqas mill-konċentrazzjonijiet inizjali. Jekk huwa rilevanti, il-metodi analitiċi għandhom ukoll ikunu sensittivi biżżejjed biex jiġi kkwantifikat kwalunkwe prodott ta' l-idrolisi li jirrappreżenta 10 % jew aktar mill-applikat (fi kwalunkwe ħin matul l-istudju) sa 25 % jew inqas mill-konċentrazzjoni l-aktar għolja tagħha.

1.7.3. **L-intervalli ta' kunfidenza għad-data kinetika ta' l-idrolisi**

L-intervalli ta' kunfidenza għandhom jinħadmu u jiġu ppreżentati għall-koeffiċjenti kollha tar-rigressjoni, il-kostanti tar-rati, il-*half-lives*, u kwalunkwe parametri kinetiċi oħrajn (eż. DT50).

1.8. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.8.1. **It-tagħmir u l-apparat**

L-istudju għandu jsir f'kontenituri tal-ħġieġ (eż. tubi tat-testijiet, fliexken żgħar) taħt kundizzjonijiet mudlama u sterili, jekk meħtieġ, kemm-il darba l-informazzjoni preliminiari (bħall-koeffiċjenti tal-qsim ta' l-n-octanol-ilma) ma tindikax li s-sustanza tat-test tista' teħel mal-ħġieġ. F'dawn il-każijiet, jistgħu jkunu jridu jitqiesu materjali alternattivi (bħal Teflon). Jista' wkoll ikun possibbli li tittaffa l-problema ta' twaħħil mal-ħġieġ bl-użu ta' wieħed jew aktar minn dawn il-metodi:

— id-determinazzjoni tal-massa tas-sustanza tat-test u tal-prodotti ta' l-idrolisi sorbiti mal-kontenitur tat-test;

— l-użu ta' banju ultrasoniku;

— tiġi żgurata ħasla bis-solventi ta' l-oġġetti kollha tal-ħġieġ f'kull intervall tat-teħid tal-kampjuni;

— l-użu ta' prodotti formulati;

— l-użu ta' ammont akbar ta' kosolvent għaż-żjieda tas-sustanza tat-test mas-sistema; jekk jintuża kosolvent għandu jkun kosolvent li ma jidrolizzax is-sustanza tat-test.

Normalment huma meħtieġa oġġetti li jaġitaw il-banju ta' l-ilma u kkontrollati mit-temperatura jew inkubaturi kkontrollati termostatikament għall-inkubazzjoni tat-taħlitiet differenti tat-test.

Huwa meħtieġ tagħmir standard tal-laboratorju, inkluż b'mod partikolari, dawn li ġejjin

— miter tal-pH;

▼B

— strumenti analitiċi bħal tagħmir GC, HPLC, TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' l-iskoperta biex jiġu analizzati sustanzi radio-tikkettjati u mhux tikkettjati jew il-metodu tat-taħlit ta' l-iżotopi inversi;

— l-istrumenti għall-iskopijiet ta' l-identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);

— kalkulatur tal-fluworexxenza tal-likwidu;

— lembub li jisseparaw għall-estrazzjoni ta' likwidi-likwidi;

— strumentazzjoni biex jiġu kkonċentrati t-taħlitiet u l-estratti (eż. evaporator li jdur);

— tagħmir li jikkontrolla t-temperatura (eż. banju ta' l-ilma).

Ir-reaġenti kimiċi jinkludu, per eżempju:

— solventi organiċi, grad analitiku, bħal hexane, dichloromethane, eċċ.;

— likwidu tal-fluworexxenza;

— taħlitiet *buffer* (għad-dettalji ara t-taqsima 1.8.3).

L-oġġetti kollha tal-ħġieġ, l-ilma tal-grad ta' reaġent u t-taħlitiet *buffer* użati fit-testijiet ta' l-idrolisi għandhom jiġu sterilizzati.

1.8.2. **L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test**

Is-sustanza tat-test għandha tiġi applikata bħala taħlita ilmija fit-taħlitiet *buffer* differenti (ara l-Anness 3). Jekk huwa meħtieġ għat-taħlit xieraq, l-użu ta' ammonti żgħar ta' solventi li jitħalltu fl-ilma (bħall-acetonitrile, acetone, etanol) huwa permess għall-applikazzjoni u d-distribuzzjoni tas-sustanza tat-test iżda dan ma għandux normalment jeċċedi 1 % v/v. Fil-każ li titqies konċentrazzjoni ogħla ta' solventi (eż. fil-każ ta' sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu), dan jista' jkun permess biss meta jista' jintwera li s-solvent ma għandu ebda effett fuq l-idrolisi tas-sustanzi tat-test.

L-użu ta' prodott formulat mhuwiex rakkomandat bħala rutina, għaliex ma jistax jiġi eskluż li l-ingredjenti tal-formulazzjoni jistgħu jinfluwenzaw il-proċess ta' l-idrolisi. Madankollu, għas-sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu fl-ilma jew għal sustanzi li jeħlu mal-ħġieġ (ara t-taqsima 1.8.1), l-użu ta' materjal formulat jista' jkun alternattiv xieraq. Għandha tintuża konċentrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test;

ma għandhiex teċċedi 0,01 M jew nofs il-konċentrazzjoni tas-saturazzjoni (ara l-Anness 1).

▼B

1.8.3. **It-taħlitiet buffer**

It-test ta' l-idrolisi għandu jitwettaq f'valuri pH ta' 4, 7 u 9. Għal dan l-iskop, it-taħlitiet *buffer* għandhom jiġu ppreparati bl-użu ta' kimiċi tal-grad ta' reaġenti u ilma. Xi sistemi utli *buffer* huma ppreżentati fl-Anness 3. Għandu jiġi nnutat li s-sistema *buffer* użata tista' tinfluwenza r-rata ta' l-idrolisi u fejn dan huwa osservat għandha tintuża sistema alternata ta' *buffer* ([1]).

Il-pH ta' kull taħlita *buffer* għandu jiġi vverifikat b' pH meter ikkalibrat sa preċiżjoni sa għall-inqas 0,1 fit-temperatura meħtieġa.

1.8.4. **Il-kondizzjonijiet tat-test**

1.8.4.1. *It-temperatura tat-test*

L-esperimenti ta' l-idrolisi għandhom isiru f'temperaturi kostanti. Għall-iskopijiet ta' l-estrapolazzjoni, huwa importanti li tinżamm it-temperatura sa għall-inqas ± 0,5 °C.

Test preliminari (Livell 1) għandu jitwettaq f'temperatura ta' 50 °C jekk l-imġieba idrolitika tas-sustanza tat-test mhijiex magħrufa. It-testijiet kinetiċi ta' Livell Ogħla għandhom isiru f'mhux inqas minn tliet temperaturi (inkluż it-test ta' 50 °C) sakemm is-sustanza tat-test hija stabbli għall-idrolisi kif determinat mill-ittestjar tal-Livell 1. Skala suġġerita tat-temperatura hija 10-70 °C (preferibbilment f'għall-inqas temperatura waħda inqas minn 25 °C użat), li jinkludi t-temperatura tar-rapportar ta' 25 °C u l-parti l-kbira tat-temperaturi misjuba fil-qasam.

1.8.4.2. *Dawl u ossiġenu*

It-testijiet ta' l-idrolisi għandhom isiru bl-użu ta' kwalunkwe metodu xieraq biex jiġu evitati effetti fotolitiċi. Il-miżuri kollha xierqa għandhom jittieħdu biex jiġi evitat l-ossiġenu (eż. bit-tbaqbiq tal-helium, nitroġenu jew argon għal 5 minuti qabel il-preparazzjoni tat-taħlita).

1.8.4.3. *Kemm idum it-test*

It-test preliminari għandu jsir għal 5 ijiem filwaqt li t-testijiet tal-Livell Ogħla għandhom isiru sad-90 % idrolisi tas-sustanza tat-test jew għal 30 jum, skond x'jiġi l-ewwel.

1.8.5. **It-twettiq tat-test**

1.8.5.1. *It-test preliminari (Livell 1)*

It-test preliminari jsir f'temperatura ta' 50 ± 0,5 °C u pH 4,0, 7,0 u 9,0. Jekk inqas minn 10 fil-mija ta' l-idrolisi jiġi osservat wara 5 ijiem ($t_{0,5}$ f'temperatura ta' 25 °C > 1 sena) is-sustanza tat-test titqies idrolitikament stabbli u, normalment, ma hu meħtieġ ebda ttestjar addizzjonali. Jekk is-sustanza hija magħrufa li hija instabbli f'temperaturi ambjentalment rilevanti ([2]), it-test preliminari mhuwiex meħtieġ. Il-metodu analitiku għandu jkun preċiż u sensittiv biżżejjed biex jiġi skopert tnaqqis ta' 10 fil-mija fil-konċentrazzjoni inizjali.

([1]) Mabey u Mill jirrakkomandaw l-użu ta' buffers tal-borate u ta' l-aċetat minflok il-fosfat (11).

([2]) Din l-informazzjoni tista' tiġi minn għejun oħrajn bħad-data ta' l-idrolisi ta' komposti strutturalment simili mil- letteraturi jew minn testijiet oħrajn preliminarji, semi-kwantattivi bis-sustanza tat-test fi stadju aktar bikri ta' l-iżvilupp.

▼B

1.8.5.2. *L-idrolisi ta' sustanzi mhux stabbli (Livell 2)*

It-test tal-Livell Ogħla (avvanzat) għandu jsir fil-valuri pH li fihom is-sustanza tat-test tinstab instabbli kif definit mit-test preliminari hawn fuq. It-taħlitiet *buffered* tas-sustanza tat-test għandhom ikunu termostatati fit-temperaturi magħżula. Biex isir it-test għall-imġieba ta' l-ewwel ordni, kull reazzjoni tat-taħlita għandha tiġi analizzata f'intervalli ta' żmien li jipprovdu minimu ta' sitt punti ta' data spazjati bejn 10 % u 90 % ta' l-idrolisi tas-sustanza tat-test. Il-kampjuni replikati tat-test individwali (minimu ta' kampjuni duplikati li jinsabu f'kontenituri separati tar-reazzjoni) għandhom jitneħħew u l-kontenuti jiġu analizzati f'kull wieħed mis-sitt drabi tat-teħid tal-kampjuni (għal mhux inqas minn tnax-il punt tad-data doppja). L-użu ta' kampjun kbir wieħed li minnhom jitneħħew l-*aliquots* individwali tat-taħlita tat-test f'kull intervall tat-teħid tal-kampjuni jitqies li mhux xieraq, għaliex ma jippermettix l-analiżi tal-varjabbiltà tad-data u jista' jwassal għal problemi bil-kontaminazzjoni tat-taħlita tat-test. It-testijiet tal-konferma ta' l-isterilità għandhom isiru fl-aħħar tat-test tal-Livell ogħla (jiġifieri f'90 % idrolisi jew 30 jum). Iżda, jekk ma tiġi osservata ebda degradazzjoni (jiġifier t-trasformazzjoni), it-testijiet ta' l-isterilità ma jitqisux meħtieġa.

1.8.5.3. *L-identifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi (Livell 3)*

Kwalunkwe prodott ewlieni ta' l-idrolisi għall-inqas dawk li jirrappreżentaw > 10 % tad-doża applikata għandu jiġi identifikat b'metodi xierqa analitika.

1.8.5.4. *Testijiet mhux obbligatorji*

It-testijiet addizzjonali f'valuri pH minbarra 4, 7 u 9 jistgħu jkunu meħtieġa għal sustanza tat-test idrolitikament instabbli. Per eżempju, għall-iskopijiet fiżjoloġiċi jista' jkun meħtieġ test taħt kondizzjonijiet aktar aċiduži (eż. pH 1.2) bl-użu ta' temperatura unika fiżjoloġikament rilevanti (37 °C).

2. **DATA**

L-ammonti tas-sustanza tat-test u tal-prodotti ta' l-idrolisi, jekk rilevanti, għandhom jingħataw bħala perċentwal tal-konċentrazzjoni inizjali applikata u, fejn xieraq, bħala mg/L għal kull interval tat-teħid tal-kampjuni u għal kull pH u temperatura tat-test. Barra minn dan, għandu jingħata bilanċ tal-massa f perċentwali tal-konċentrazzjoni inizjali applikata meta ntużat sustanza tat-test ittikkettjata.

Preżentazzjoni grafika tad-data ta' logs trasformati tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test maż-żmien għandha tiġi rrapportata. Kwalunkwe prodott ewlieni ta' l-idrolisi għall-inqas dawk li jirrappreżentaw ≥ 10 % tad-doża applikata li għandu jiġi identifikat bil-konċentrazzjonijiet tal-logs trasformati għandu wkoll jista' jiġi ppjanat bl-istess mod bħas-sustanza ewlenija biex jidhru r-rati tal-formazzjoni u tat-tnaqqis tagħhom.

▼B

2.1. IT-TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Determinazzjonijiet aktar preċiżi ta' *half-lives* jew ta' valuri DT_{50} għandha tinkiseb bl-applikazzjoni ta' kalkoli xierqa tal-mudelli kineṫiċi il-valuri *t*al-*half-life* u/jew DT_{50} (inklużi l-limiti tal-kunfidenza) għandhom jiġu rrapportati għal kull pH u kull temperatura flimkien ma' deskrizzjoni tal-mudell użat, l-ordni tal-kinetika u l-koeffiċjenti tad-determinazzjoni (r^2). Jekk xieraq, il-kalkoli għandhom ukoll jiġu applikati għall-prodotti ta' l-idrolisi.

Fil-każ ta' studju ta' rati mwettqa f temperaturi differenti, il-kostanti ta' l-idrolisi tal-psewdo-ewwel ordni (k_{obs}) għandhom jiġu deskritti bħala funzjoni tat-temperatura. Il-kalkolu għandu jiġi bbażat fuq kemm is-separazzjoni tal-kobs f kostanti tar-rati għall-idrolisi katalizzata bl-aċidu, newtrali u kkatalizzati bil-bażi (k_H, $k_{neutral}$, u k_{OH} rispettivament) u l-ekwazzjoni ta' Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

fejn Ai u Bi huma kostanti tar-rigressjoni mill-interċett u l-gradjent, rispettivament, tal-linji li joqogħdu l-aħjar iġġenerati mir-rigress lineari ln ki kontra r-reċiproku tat-temperatura assoluta f Kelvin (T). Bl-użu tar-relazzjonijiet ta' Arrhenius għall-idrolisi kkatalizzata aċida, newtrali u bażi, il-kostanti tar-rata psewdo l-ewwel ordni, u għalhekk *half-lives* jistgħu jiġu kkalkolati għal temperaturi oħrajn li għalihom id-determinazzjoni diretta esperimentali tal-kostant tar-rata mhijiex prattikabbli (10).

2.2. L-EVALWAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Il-parti l-kbira tar-reazzjonijiet ta' l-idrolisi jsegwu r-rati apparenti tar-reazzjonijiet ta' l-ewwel ordni u, għalhekk, il-*half-lives* huma indipendenti mill-konċentrazzjoni (ara l-ekwazzjoni 4 fl-Anness 2). Dan normalment jippermetti l-applikazzjoni tar-riżultati tal-laboratorju determinati bħala 10^{-2} sa 10^{-3} M għal kondizzjonijiet ambjentali ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Bosta eżempji ta' ftehim tajjeb bejn ir-rati ta' l-idrolisi mkejla f'ilmijiet kemm puri kif ukoll naturali għal varjetà ta' kimiċi ġew irrapportati minn Mabey u Mill (11), kemm-il darba kemm il-pH kif ukoll it-temperatura kienu tkejlu.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi għall-inqas din l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— isem komuni, isem tal-kimika, CAS numru, formula strutturali (li tindika l- pożizzjoni tat-tikketta meta jintuża materjal radjotikkettjat) u karatteristiċi rilevanti fiżiċi-kimiċi (ara t-taqsima 1.5);

— purità (impuritajiet) tas-sustanza tat-test;

— purità tat-tikketta ta' kimika ttikkettjata u attività molari (fejn xieraq).

▼B

— taħlitiet *buffer*:

— dati u dettalji tal-preparazzjoni

— *buffers* u ilmijiet użati;

— molarità u pH tat-taħlitiet *buffer*.

Il-kondizzjonijiet tat-test:

— id-dati tat-twettiq ta' l-istudji;

— l-ammont tas-sustanza tat-test applikati;

— il-metodu u s-solventi (tip u ammont) użati għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;

— il-volum tat-taħlitiet *buffered* tas-sustanza tat-test inkubati;

— deskrizzjoni tas-sistema ta' inkubazzjoni użata;

— pH u temperatura matul l-istudju;

— ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni;

— metodu/i ta' l-estrazzjoni;

— metodi biex jiġu kkwantifikati u identifikati s-sustanza tat-test u l-prodotti ta'l- idrolisi tagħha fit-taħlitiet *buffer*;

— għadd ta' replikati.

Riżultati:

— repetibbiltà u sensittività tal-metodi analitiċi użati;

— rkupru (valuri % għal studju validu jingħataw fit-taqsima 1.7.1);

— *data* replikata u mezzi f'forom tabulari;

— bilanċ tal-massa matul u fl-aħħar ta' l-istudji (meta tintuża sustanza tat-test ittikkettjata);

— riżultati tat-test preliminari;

— diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;

— id-*data* u l-figuri kollha oriġinali.

Din l-informazzjoni li ġejja hija meħtieġa biss meta hija ddeterminata r-rata ta' l- idrolisi:

— ippjanar fuq dijagramma ta' konċentrazzjonijiet kontra ħin għas-sustanzi tat-testu, fejn xieraq, għall-prodotti ta' l-idrolisi għal kull valur ta' pH u temperatura;

— tabelli tar-riżultati ta' l-ekwazzjoni Arrhenius għat-temperatura 20 °C/25 °C, bil-pH, kostant tar-rata [h-1 jew jum-1], *half-life* jew DT50, temperaturi [°C] inklużi limiti tal-kunfidenza u l-koeffiċjenti tal-korrelazzjoni (r_2) jew informazzjoni komparabbli;

— rotta proposta ta' l-idrolisi.

▼B

4. **REFERENZI**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

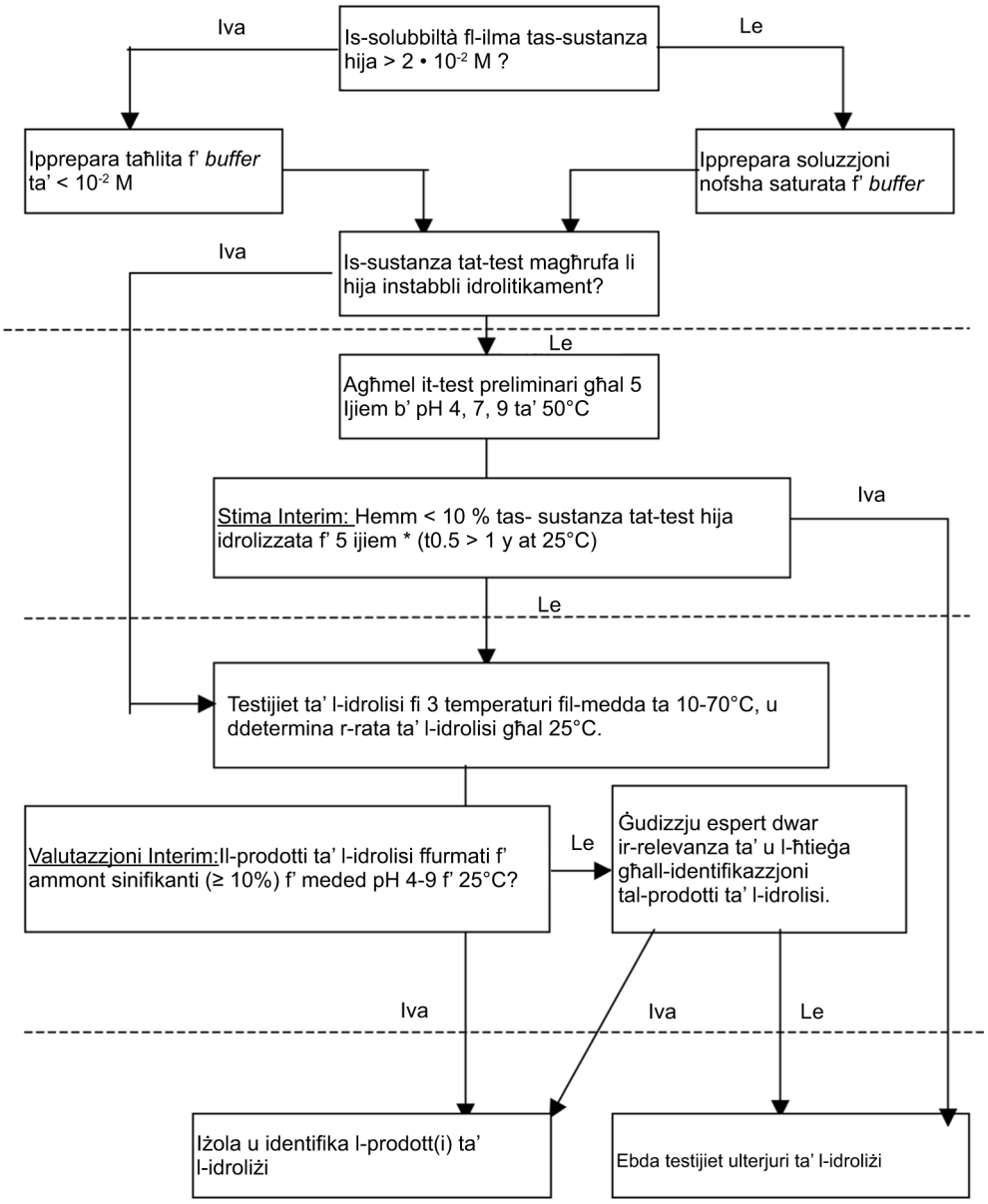
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

ANNESS 1

Tiered Hydrolysis Test Scheme



* 10% hydrolysis of a test substance at 50°C corresponds to a half-life of approx. 30 days which corresponds to a value of approx. 1 year at 20°C.

▼B

ANNESS 2

Definizjonijiet u Unitajiet

L-Unitajiet In d Inte w fi kwalunkwe każ.

Sustanza tat-Test: kwalunkwe sustanza, kemm jekk il-kompost ewlieni kif ukoll prodotti rilevanti tat-trasformazzjoni.

Prodotti tat-trasformazzjoni: is-sustanzi kollha li jirriżultaw minn reazzjonijiet biotiċi jew abiotiċi tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test.

Prodotti ta' l-idrolisi: is-sustanzi kollha li jirriżultaw mir-reazzjonijiet tat-trasformazzjoni idrolitika tas-sustanza tat-test.

Idrolisi tirreferi għal reazzjoni ta' sustanza tat-test RX ma' l-ilma, bl-iskambju nett tal-grupp X ma' l-OH fiċ-ċentru tar-reazzjoni:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Ir-rata li biha l-konċentrazzjoni ta' RX tonqos f'dan il-proċess simplifikat tingħata b'

$rata = k\ [H_2O]\ [RX]$ reazzjoni tat-tieni ordni

jew

$rata = k\ [RX]$ reazzjoni ta' l-ewwel ordni

skond il-pass li jiddetermina r-rata. Minħabba li l-ilma huwa preżenti f'eċċess kbir meta mqabbel mas-sustanza tat-test, dan it-tip ta' reazzjoni normalment huwa deskritt bhala reazzjoni tal-psewdo-ewwel ordni fejn il-kostant tar-rata osservat jingħata bir-relazzjoni

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

u jista' jiġi ddeterminat mill-espressjoni (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

fejn

t = ħin

u C_o, C_t = konċentrazzjonijiet ta' RX fil-ħinijiet 0 u t.

L-*unitajiet* ta' dan il-konstant għandhom id-dimensjonijiet ta' $(ħin)^{-1}$ u l-*half-life* tar-reazzjoni (ħin biex 50 % ta' RX jirreaġixxi) jingħata b'

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Half-life: ($t_{0,5}$) huwa l-ħin meħud għal 50 % idrolisi ta' sustanza tat-test meta r-reazzjoni tista' tiġi deskritta b'kinetiċi ta' l-ewwel ordni; huwa indipendenti mill-konċentrazzjoni.

(*) Jekk it-tpinġija fuq djagramma tad-*data* ta' *logs* ittrasformati ta' *data vs*. ħin ma tindikax funzjoni lineari (ekwata ma' rata ta' reazzjoni ta' l-ewwel ordni), allura l-użu ta' l-ekwazzjoni [3] mhuwiex xieraq biex jiġi ddeterminat il-konstant tar-rata ta' l-idrolisi tal-kompost tat-test.

▼B

DT_{50} (*Disappearance Time* (hin biex jisparixxi) 50): huwa l-ħin li fih il-konċentrazzjoni tat-test titnaqqas b'50 %; huwa different mill-*half-life* $t_{0,5}$ meta r-reazzjoni ma ssegwix kinetiċi ta' l-ewwel ordni.

Stima ta' k f'temperatura differenti

Meta l-konstanti tar-rata huma magħrufa għal żewġ temperaturi, il-kostanti tar-rata f'temperaturi oħrajn jistgħu jiġu kkalkolati bl-użu ta' l-ekwazzjoni ta' Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ jew } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Tpinġija fid-djagramma ta' ln k versus 1/T tagħti linja dritta bi gradjent ta'–E/R

Fejn

k = kostant tar-rata, imkejjel b'temperaturi differenti

E = enerġija ta' l-attivazzjoni [kJ/mol]

T = temperatura assoluta [K]

R = kostant tal-gass [8,314 J/mol.K]

L-enerġija ta' l-attivazzjoni ġiet ikkalkolata bl-analiżi tar-rigressjoni jew l-ekwazzjoni li ġejja:

$$E = \text{R} \times \frac{\ln k_2 - ln\, k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

fejn: $T_2 > T_1$.

▼B

L-ANNESS 3

Sistemi *Buffer*

A. **CLARK U LUBS:**

Taħlitiet *Buffer* ta' CLARK u LUBS (*)

Kompożizzjoni	pH
0,2 N HCl U 0,2 N KCl AT 20 °C	
47,5 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,0
32,25 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,2
20,75 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,4
13,15 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,6
8,3 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,8
5,3 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	2,0
3,35 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	2,2
0,1 M potassium biphthalate + 0,1 N HCl f'temperatura ta' 20 °C	
46,70 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,2
39,60 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,4
32,95 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,6
26,42 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,8
20,32 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,0
14,70 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,2
9,90 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,4
5,97 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,6
2,63 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate to 100 ml	3,8
0,1 M potassium biphthalate + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 °C	
0,40 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,0
3,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,2
7,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,4
12,15 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,6
17,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,8

(*) Il-valur pH irrapportati f'dawn it-tabelli ġew ikkalkolati mill-kejl potenzjali bl-użu ta' ekwazzjonijiet standard ta' Sörensen (1909). Il-valuri pH korrispondenti huma 0,04 unitajiet oqħla mill-valuri tabulate.

▼B

Kompożizzjoni	pH
23,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,0
29,95 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	5,2
35,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,4
39,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,6
43,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	5,8
45,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	6,0

Taħlitiet *Buffer* ta' CLARK u LUBS (Ikompli)

0,1 M monopotassium phosphate + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 °C	
5,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,0
8,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,2
12,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,4
17,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,6
23,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,8
29,63 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,0
35,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,2
39,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,4
42,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,6
45,20 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,8
46,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 °C	
2,61 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	7,8
3,97 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,0
5,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,2
8,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,4
12,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,6
16,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,8
21,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,0
26,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,4
36,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,6
40,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,8
43,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF U VLEESCHHOUWER:**

***Buffers* taċ-ċitrat ta' KOLTHOFF u VLEESCHHOUWER**

Kompożizzjoni	pH
0,1 M ċitrat tal-monopotassju u 0,1 N HCl f'temperatura ta' 18 °C (*)	
49,7 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,2
43,4 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,4
36,8 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,6
30,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,8
23,6 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,0
17,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,2
10,7 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,4
4,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,6
0,1 M ċitrat tal-monopotassju u 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 18 °C (*)	
2,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,8
9,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,0
16,3 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,2
23,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,4
31,5 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,6
39,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,8
46,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,0
54,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,2
61,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,4
68,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,6
74,4 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,8
81,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	6,0

(*) Żid kristall żgħir ħafna ta' timol jew sustanza simili biex jitrażżan it-tkabbir tal-moffa.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Taħlitiet Borate ta' SÖRENSEN

Kompożizzjoni		Sörensen 18 °C	Walbum, pH f'temperatura ta'		
ml. Borax	ml. HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Taħlitiet tal-fosfat ta' SÖRENSEN

Kompożizzjoni	pH
0,0667 M Monopotassium phosphate + 0,0667 M Disodium phosphate f'temperatura ta' 20 °C	
99,2 ml. KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml. KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml. KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml. KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml. KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml. KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml. KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml. KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml. KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml. KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml. KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml. KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml. KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml. KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml. KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml. KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. IT-TOSSIĊITÀ TAL-ĦNIEX

IT-TEST TAL-ĦAMRIJA ARTIFIĊJALI

1. **IL-METODU**

1.1. L-INTRODUZZJONI

F'dan it-test tal-laboratorju, is-sostanza tat-test hija miżjuda mal-ħamrija artifiċjali li l-ħniex ikunu mpoġġija fiha għal 14-il ġurnata. Wara dan il-perjodu (u b'għażla wara sebat'ijiem) l-effett letali tas-sostanza fuq il-ħniex hija eżaminata. It-test jipprovdi metodu għal superviżjoni relativvament għall-perjodu qasir ta' l-effett tal-kimiċi fuq il-ħniex, bit-teħid tal-ġilda jew alimentari.

1.2. ID-DEFINIZZJONI U L-UNITÀ

LC_{50}: Il-konċentrazzjoni tas-sostanza stmata bħala li toqtol 50 % ta' l-annimali ttestjati waqt il-perjodu tat-test.

1.3. IS-SOSTANZA TAR-REFERENZA

Is-sostanza tar-referenza hija użata perjodikament bħala mezz ta' dimostrazzjoni li s-sensitività tas-sistema tat-test ma nbidlitx b'mod sinifikattiv.

Il-chloroacetamide analitiku tal-grad huwa rakkomandat bħala s-sostanza referenza.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-ħamrija hija mezz varjabbli, u għalhekk għal dan it-test il-ħamrija artifiċjali tal-lom definita hija użata. Il-ħniex adulti ta' l-ispeċi Eisenia foetida (ara n-nota fl-Appendiċi) huma miżmuma f'ħamrija artifiċjali definita trattata b'konċentrazzjonijiet differenti tas-sostanzi tat-test. Il-kontenut tal-kontenituri huwa mifrux fuq gabarre 14-il ġurnata (u b'għażla sebat'ijiem) wara l-bidu tat-test, u l-ħniex li jibqgħu ħajjin f'kull konċentrazzjoni jkunu magħduda.

1.5. IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ

It-test huwa disinnjat biex ikun riproduċibbli kemm jista' jkun fir-rigward tas-substrat u l-organiżmu tat-test. Il-mortalità fil-kontrolli m'għandhix taqbeż l-10 % fl-aħħar tat-test, jew inkella it-test ikun invalidu.

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. *Il-materjali*

1.6.1.1. Is-substrata tat-test

Il-ħamrija artifiċjali definita hija użata bħala substrat bażiku għat-test.

(a) Is-substrata bażika (il-persentaġġi huma fit-termini tal-piż niexef)

— 10 % pit Sphagnum (kemm jista' jkun l-aktar qrib għall-pH 5,5 sa 6,0 bl- ebda fdalijiet tal-pjanti li jidhru u mitħun fin),

▼B

— 20 % tafal tal-kawlina bi preferibbilment aktar minn 50 % kawlina,

— Madwar 69 % ramel tal-kwarz industrijali (ramel fin dominanti b'aktar minn 50 % tal-qies tal-partiċelli ta' 0,05 sa 0,2mm). Jekk is-sostanza m'hijiex suffiċjentament abbli li tinfirex fl-ilma, 10g għal kull kontenitur tat-test għandhom jinżammu disponibbli biex jitħalltu mas-sostanza tat-test aktar tard, miż

— Madwar 1 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$), fi trab, kimikament pur, żjud biex il-pH jinġieb sa 6,0 ± 0,5.

(b) Is-substrata tat-test

Is-substrata tat-test ikun fiha is-substrata bażika, is-sostanza tat-test u l-ilma detonizzat.

Il-kontenut ta' l-ilma huwa ta' madwar 25 sa 42 % tal-piż niexef tas-substrata bażika. Il-kontenut ta' l-ilma tas-substrata huwa determinat billi jkun imnixxef kampjun għall-piż kostanti ta' 105 °C. Il-kriterju prinċipali huwa li l-ħamrija artifiċjali għandha tkun imxarrba sal-punt fejn m'hemm l-ebda ilma qiegħed. Għandu jkun hemm attenzjoni meta' jkun qed isir it-taħlit biex tkun miksuba distribuzzjoni ugwali tas-sostanza tat-test u tas-substrata. Il-mod ta' kif tkun introdotta is-sostanza tat-test mas-substarata għandu jkun rappurtat.

(ċ) Is-substrata tal-kontroll

Is-substrata tal-kontoll fiha is-substrata bażika u l-ilma. Jekk aġent addittiv ikun użat, il-kontroll addizzjonali għandu jkun fih l-istess kwantità ta' l-aġent addittiv.

1.6.1.2. Il-kontenituri ta' l-ittestjar

Il-kontenituri tal-ħġieġ ta' madwar litru kapaċità (adegwatament miksija bl-għatien tal-plastik, id-dixxijiet jew l-film tal-plastic bit-toqob għall-ventilazzjoni) mimlija b'ammont tas-substrata mxarrba tat-test jew tal-kontroll ekwivalenti għall-500g tal-piż niexef tas-substrata.

1.6.2. *Il-kondizzjonijiet tat-test*

Il-kontenituri għandhom jinżammu fi kmamar klimatiċi f'temperatura ta' 20 ± 2 °C bid-dawl kontinwu. L-intensità tad-dawl għandha tkun ta' 400 sa 800 lux.

Il-perjodu tat-test huwa ta' 14-il ġurnata, iżda l-mortalità tista' tkun stmata b'għażla ta' sebat'ijiem wara li jibda t-test

1.6.3. *Il-proċedura tat-test*

Il-konċentrazzjonijiet tat-test

Il-konċentrazzjonijiet tas-sostanza tat-test huma espresse bħala piż tas-sostanza għall-piż niexef tas-substrata bażika (mg/kg).

It-test biex jinstabu l-limiti

Il-limiti tal-konċentrazzjonijiet li jikkawża mortalità ta' 0 sa 100 % biss jistgħu jkunu determinati f'test biex jinstabu l-limiti biex tkun provvduta l-informazzjoni fuq il-limiti tal-konċentrazzjonijiet li għandhom jintużaw fit-test definittiv.

▼B

Is-sostanza għandha tkun ittestjata fil-konċentrazzjonijiet li ġejjin: 1 000; 100; 10; 1; 0,1mg tas-sostanza/kilogramma tas-substrata tat-test (il-piż niexef).

Jekk it-test sħiħ definittiv għandu jkun magħmul, grupp wieħed għal kull konċentrazzjoni u wieħed għall-kontroll mhux trattat, kull wieħed b'għaxar ħniex, għandu jkun suffiċjenti għat-test biex jinstabu l-limiti.

It-test definittiv

Ir-riżultati għat-test biex jinstabu l-limiti huma wżati biex jintgħażlu minn ta' l-anqas ħames konċentrazzjonijiet f'serje ġeometrika li tilħaq eżatt il-limiti ta' bejn 0 sa 100 % tal-mortalità u li tinbidel b'fattur kostanti li ma jaqbiżx il-1,8.

It-testijiet li jużaw din is-serje ta' konċentrazzjoni għandhom iħallu l-valur LC_{50} u l-limiti tiegħu ta' kunfidenza biex ikunu stmati kemm jista' jkun b'mod preċiż.

Fit-test definittiv minn ta' l-anqas erba' gruppi tat-testijiet għal kull konċentrazzjoni u erba' kontrolli mhux trattati, kull wieħed b'10 ħniex, huma wżati. Ir-riżultati ta' dawn il-gruppi repliki huma mogħtija bħala devjazzjoni medja u standard.

Meta' żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi, b'rata ta' 1,8, jagħtu biss 0 u 100 % mortalità, dawn iż-żewġ valuri huma suffiċjenti biex jindikaw il-limiti li fihom jaqa' l- LC_{50}.

It-taħlita tas-substrata bażika tat-test u s-sostanza tat-test

Is-substrata tat-test għandha, kull meta' jkun possibbli, tkun magħmula mingħajr ebda aġenti addizzjonali minbarra l-ilma. Immedjatament qabel il-bidu tat-test, l-emulsjoni jew it-tixrid tas-sostanza tat-test f'ilma mingħajr jonji jew f'xi solvent ieħor tiġi mħallta mas-substrata bażika tat-test, jew sprejjat b'mod ugwali fuqha bi sprej fin kromotagrafiku jew ieħor simili.

Jekk ma tkunx tinħall fl-ilma, is-sostanza tat-test tista' tkun maħlula f'volum żgħir kemm jista' jkun ta' solvent organiku adattat (eż. hexane (idrokarbon likwidu), aċeton jew kloroform).

Dawk l-aġenti biss li jtiru malajr jistgħu jkunu wżati biex ikunu iħollu, jferrxu jew jemulsifaw is-sostanza tat-test. Is-substrata tat-test għandha tkun ventilata qabel l-użu. L-ammont ta' ilma evaporat għandu jkun sostitwit. Il-kontroll għandu jkollu l-istess kwantità ta' kwalunkwe aġenti addittiv.

Jekk is-sostanza tat-test ma tkunx solubbli, li tista' tinfirex jew li tista' tkun emulsifata fis-solventi organiċi, 10g tat-taħlita tar-ramel miħun fin tal-kwarz u kwantità tas-sostanza tat-test neċessarja biex titratta 500g piż niexef tal-ħamrija artifiċjali huma mħallta ma 490g tal-piż niexef tas-substrata tat-test.

Għall kull grupp tat-test, ammont tas-substrata tat-test imxarrba ekwivalenti għal 500g piż niexef tiġi mpoġġija f'kull kontenitur tal-ħġieġ u 10 ħniex, li kienu kkondizzjonati għal 24 siegħa f'substrata simili mxarrba u mbagħad maħsula malajr u l-ilma żejjed mixrub fuq karta li tiffiltra qabel l-użu, huma mpoġġija fuq il-wiċċ tas-substrata tat-test.

▼B

Il-kontenituri huma mgħottija bl-għatien tal-plastic imtaqqba, bid-dixxijiet jew bil-fil̇m biex ikun evitat li s-substrata tinxef u dawn huma miżmumin taħt il-kondizzjonijiet tat-test għal 14-il ġurnata.

L-istimi għandhom ikunu magħmula 14-il-ġurnata (u b'għażla seba' t'ijiem) wara li jkun magħmul it-test. Is-substrata tiġi mifruxa fuq platt magħmul mill-ħġieġ jew ta' l-azzar li ma jissaddadx. Il-ħniex jiġu eżaminati u n-numru tal-ħniex li għexu għandu jkun determinat. Il-ħniex huma kkonsidrati mejta jekk dawn ma jirrispondux għal stimulu ġentili u mekkaniku mat-tarf ta' quddiem.

Meta' l-eżaminazzjoni tkun magħmula fis-seba' ġurnata, il-kontenitur għandu jerġa' jimtela bis-substrata u l-ħniex li għex għandu jkun sostitwit fuq l-istess wiċċ tas-substrata tat-test.

1.6.4. *L-organiżmi tat-test*

L-organiżmi tat-test għandhom ikunu adulti ta' l-*Eisenia foetida* (ara n-nota fl-Appendiċi) (minn ta' l-anqas ta' żmien xahrejn bil-clitellum) tal-piż imxarrab ta' 300 sa 600 mg. (Għall-metodu tat-tgħammir ara l-Appendiċi).

2. **ID-DATA**

2.1. IT-TRATTAMENT U L-VALUTAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Il-konċentrazzjonijiet tas-sostanza ttestjata huma rappurtati bir-referenza għall-persentaġġi korrispondenti tal-ħniex mejta.

Meta' d-data tkun adegwata il-valur ta' l- LC_{50} u l-limiti tal-kunfidenza (p = 0,05) għandhom ikunu determinati billi jintużaw il-metodi standard (Litchfield u Wilcoxon, 1949, għall-metodu ekwivalenti). L- LC_{50} għandu jkun mogħti bħala mg tas-sostanza tat-test għal kull kilogramma tas-substrata tat-test (piż niexef).

F'dawk il-każijiet meta' it-tidwira tal-kurva tal-konċentrazzjoni hija wisq wieqfa biex tippermetti l-kalkulazzjoni ta' l- LC_{50}, stima grafika ta' dan il-valur hija suffiċjenti.

Meta' żewġ konċentrazzjonijiet bħala rata ta' 1,8 jagħtu biss 0 % u 100 % mortalità, iż-żewġ valuri huma suffiċjenti biex jindikaw il-limiti li fihom jaqa' l-LC_{50}.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test jekk possibbli, għandu, jkun fih dan li ġej:

— id-dikjarazzjoni li t-test kien magħmul skond il-kriterji tal-kwalità msemmija aktar 'il fuq,

— it-test magħmul (it-test li jsib il-limiti u/jew it-test definittiv),

— id-deskrizzjoni eżatta tal-kondizzjonijiet tat-test jew id-dikjarazzjoni li t-test kien magħmul skond il-metodu; kwalunkwe devjazzjonijiet għandhom ikunu rappurtati,

— id-deskrizzjoni eżatta ta' kif is-sostanza tat-test tiġi mħallta mas-subtrata bażika tat-test,

— l-informazzjoni dwar l-organiżmi tat-test (l-ispeċi, iż-żmien, il-medja u l-limiti tal-piż, il-kondizzjonijiet taż-żamma u n-nifs, il-fornitur),

▼B

— il-metodu użat għad-determinazzjoni ta' l- LC_{50},

— ir-riżultati tat-test inkluża d-data kollha użata,

— id-deskrizzjoni tas-sintomi jew il-bidliet osservati fl-aġir ta' l-organismi tat-test,

— il-mortalità fil-kontrolli,

— l- LC_{50} jew il-konċentrazzjoni l-aktar għolja ttestjata mingħajr il-mortalità u l-konċetnrazzjoni l-aktar baxxa b'mortalità ta' 100 %, 14-il ġurnata (u b'għażla ta' seba' t'ijiem) wara li jkun mibdi t-test,

— it-tpinġija tal-kurva tal-konċentrazzjoni/respons,

— ir-riżultati miksuba bis-sustanza tar-referenza, kemm jekk bl-assoċjazzjoni mat-test preżenti jew mill-eżerċizzji ta' qabel tal-kontroll tal-kwalità.

4. **REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, Test Guideline 207, id-Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali.

(2) Edwards, C.A. and Lofty, J.R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, Londra, 331pp.

(3) Bouche, M.B., 1972, Lombriciens de France, Ècologie et Systèmatique, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. J.Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Il-Kummissjoni tal-Kommunitajiet Ewropej, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Rapport EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag “Toxiżitatstest am Regenwurm Eisenia foetidia in kunstlichem Boden”, f': Rudolph/Boje, Okotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Appendiċi

It-tgħammir u ż-żamma tal-ħniex qabel l-ittestjar

Biex jitgħammru l-annimali, 30 sa 50 ħanex adult, jitpoġġew f'kaxxa tat-tgħammir bis-substrata friska u mneħħija wara 14-il ġurnata. Dawn l-annimali jistgħu jkunu wżati għal gruppi oħra tat-tgħammir. Il-ħniex imfaqqsa mill-fosdqa huma wżati għall-ittestjar meta' jkunu maturi (taħt il-kondizzjonijiet preskritti wara xahrejn jew tlett xhur).

Il-kondizzjonijiet taż-żamma u tat-tgħammir

Il-kamra klimatika:	it-temperatura ta' 20 ± 2 °C preferibilment bid-dawl kontinwu (intensita' ta' 400 sa 800 lux).
Il-kaxxa tat-tgħammir:	il-kontenituri baxxi adattati tal-volum ta' 10 sa 20 l.
Is-substrata:	L-*Eisenia foetida* tista' titrabba fl-eskrimenti ta' annimali varji. Huwa rakkomandat li bħala mezz tat-tgħammir tintuża taħlita ta' 50 % mill-volum pit u 50 % demel tal-baqar jew taż-żwiemel. Il-mezz għandu jkollu valur tal-pH ta' madwar 6 sa 7 (refolat bil-karbonju tal-kalċju) u konduttività tal-jonje baxxa (anqas minn 6 mmhos jew 0,5 % konċentrazzjoni tal-melħ). Is-substrata għandha tkun niedja iżda mhux imxarrba żżejjed. Il-proċeduri l-oħra ta' suċċess jistgħu jkunu wżati minbarra l-metodu mogħti hawn fuq.

Nota: L-*Eisenia foetida* teżisti f'żewġ razez li ċerti tassonomi sseparaw fi speċi (Bouche, 1972). Dawn huma morfoloġikament simili minnbarra waħda, *Eisenia foetida foetida*, li għandha strixxi tipikament transversi jew faxxi fuq is-segmenti u l-oħra, *Eisenia foetida andrei*, li m'għandix dan u għandha kulur aħmar varjegat. Fejn hu possibbli l-*Eisenia foetida andrei* għandha tintuża. L-ispeċi l-oħra jistgħu jkunu wżati jekk il-metodoloġija neċessarja hija disponibbli.

▼B

C.9. **ID-DEGREDAZZJONI BIJOLOĠIKA**

IT TEST TA' WELLENS –ZAHN

1. **IL-METODU**

1.1. L-INTRODUZZJONI

Ir-raġuni tal-metodu hija l-valutazzjoni ta' bijodegradabilità potenzali u aħħarija tas-sostanzi li jinħallu fl-ilma, li mhumiex volatili u organiċi meta' dawn ikunu esposti għall-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin ta' mikroorganiżmi f'test statiku.

L-assorbiment fiżikukimiku fuq is-solidi sospiżi jista' jsir u dan għandu jittieħed in konsiderazzjoni meta' jkunu qegħdin jiġu interpretati r-riżultati (ara 3.2).

Is-sostanzi li għandhom ikunu studjati huma wżati f'konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu għall-valuri DOC fil-limiti ta' 50 sa 400 mg/litru jew il-valuri COD fil-limiti ta' 100 sa 1 000 mg/litru (DOC = il-karbonju organiku maħlul; COD = id-domanda għall-ossiġnu kimiku). Dawn il-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin għandhom il-vantaġġ li huma affidabbli b'mod analitiku. Il-komposti bil-proprjetajiet tossiċI jistgħu itawwlu jew iwaqqfu il-proċess ta' degradazzjoni.

F'dan il-metodu, il-kejl tal-konċentrazzjoni tal-karboju organiku maħlul jew id-domanda għall-ossiġnu kimiku huwa wżat biex jistima il-bijodegradabilità aħħarija tas-sostanza tat-test.

L-użu simultanju tal-metodu speċifiku analitiku jista' jippermetti l-istimar tal-bijodegradazzjoni primarja tas-sostanza (it-tneħħija ta' l-istruttura kimika maġġuri).

Il-metodu huwa applikabbli biss għal dawk is-sostanzi organiċi tat-test li, fil-konċentrazzjoni użata fit-test:

— huma solubbli fl-ilma taħt il-kondizzjonijiet tat-test,

— għandhom pressjoni tal-fwar insinjifikanti taħt il-kondizzjonijiet tat-test,

— li mhumiex inibitorji għall-batterji,

— li huma mixruba fis-sistema tat-test biss sa' ċertu limitu,

— li mhumiex mitlufa fir-rawha mis-soluzzjoni tat-test.

L-informazzjoni fuq il-proporzjoni relattivi tal-komponenti maġġuri tal-materjal tat-test għandu jkun utli biex ikunu interpretati r-riżultati miksuba, partikolarment f dawk il-każijiet fejn ir-riżultati huma baxxi jew marġinali.

L-informazzjoni fuq it-toxiċità tas-sostanza għall-mikro-organiżmi hija mixtieqa għall-interpretazzjoni tar-riżultati baxxi u fl-għażla tal-konċentrazzjoni adattati tat-test.

▼B

1.2. ID-DEFINIZZJONIJIET U L-UNITAJIET

L-ammont ta' degradazzjoni miksuba fl-aħħar tat-test hija rappurtata bħala "Il-bijodegradabilità fiz-Zahn – it-test ta' Wellens":

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{C_T - C_B}{C_A - C_{BA}}\right] \times 100$$

fejn:

DT = id-degradazzjoni bijoloġika (%) fil-ħin T,

CA = DOC (jew COD) valuri fit-taħlita tat-test imkejla tlett siegħat wara l-bidu tat-test (mg/l) (DOC = Il-Karbonju Organiku Maħlul, COD = Id-domanda għall-Ossiġnu Kimiku),

CT = il-valuri DOC jew COD fit-taħlita tat-test fil-ħin tat-teħid tal-kampjun (mg/l),

CB = il-valuri DOC jew COD tal-vojt fil-ħin tat-teħid tal-kampjun (mg/l),

CBA = il-valuri DOC jew COD tal-vojt, mkejla tlett siegħat wara l-bidu tat-test (mg/l).

Il-limitu tad-degradazzjoni huwa miżjud għall-eqreb persentaġġ sħiħ.

Il-persentaġġ tad-degradazzjoni huwa dikjarat bħala l-persentaġġ DOC (jew COD) ta' tneħħija tas-sostanza ttestjata.

Id-differenza bejn il-valur imkejjel wara tlett siegħat u l-valur inizjali kkalkulat jew preferibbilment imkejjel jista' jipprovdi informazzjoni utli fuq l-eliminazzjoni tas-sostanza (ara 3.2, L-interpretazzjoni tar-riżultati).

1.3. IS-SOSTANZI TAR-REFERENZA

F'ċerti każijiet meta' jkunu qegħdin jiġu investigati sostanzi ġodda s-sostanzi tar-referenza jistgħu jkunu utli; madanakollu, s-sostanzi speċifiċI tar-referenza ma jistgħux ikunu rakkomandati.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-tajn oħxon attivat, in-nutrijenti minerali u l-materjali ta' l-ittestjar bħala l-unika sors tal-karbonju f'soluzzjoni mimlija ilma huma mpoġġija flimkien f'reċipjent tal-ħġieġ li jieħu minn litru sa erba' litri mgħammar b'aġitatur u b'apparat li jagħti l-arja. It-taħlita tiġi aġitata u mogħtija l-arja f 20 to 25 °C taħt l-illuminazzjoni mferrxa jew f'kamra mudlama sa 28 ġurnata. Il-proċess ta' degradazzjoni jiġi kkontrollat bid-determinazzjoni tal-valuri tad-DOC (jew is-COD) fis-soluzzjoni ffiltrata f'intervalli ta' kuljum jew f'intervalli oħra tal-ħin adattati. Ir-rata tad-DOC (jew COD) eliminati wara kull intervall għall-valur tlett siegħat wara l-bidu hija espressa bħala persentaġġ ta' bijodegradazzjoni u sservi bħala kejl tal-limitu ta' degradazzjoni f'dan il-ħin. Ir-riżultat ikun impinġi versus il-ħin biex jagħti l-kurva tal-bijodegradazzjoni.

Meta' l-metodu speċifiku analitiku jkun użat, it-tibdiliet fil-konċentrazzjoni tal-molekula maġġuri minħabba d-degradazzjoni tista' tkun imkejla (bijodegradabilità primarja).

▼B

1.5. IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ

Ir-riproduċibilità ta' dan it-test ġie pruvat li hi sodisfaċenti f'test ċirku.

Is-sensittività tal-metodu hija determinata l-aktar mill-varjabilità tal-vojt u, anqas, mill-preċiżjoni tad-determinazzjoni tal-karbonju organiku maħlul u l-livell tal-kompost tal-likur tat-test.

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-PROĊEDURA TAT-TEST

1.6.1. *Il-preparazzjonijiet*

1.6.1.1. I r - r e a ġ e n t i

L-ilma tat-test: l-ilma tax-xorb bil-kontenut tal-karbonju organiku < 5mg/litru. Il-konċentrazzjoni tal-jonji tal-kalċju u tal-manjesju flimkien ma jistgħux jaqbżu il-2,7 mmole/litru; jew inkella it-taħlit adegwat ma' l-ilma dejonizzat jew distillat huwa meħtieġ.

L-aċidu sulfuriku, ir-reaġent analitiku (A.R.): 50 g/l

Is-soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju A.R.: 40 g/l

Is-soluzzjoni nutrijenti tal-minerali: ħoll f'litru ilma dejonizzat:

Il-klorit ta' l-ammonja, NH4Cl, A.R.: 38,5 g

Dihydrogenphosphate tas-sodju, NaH2PO4.2H2O, A.R.: 33,4 g

Dihydrogenphosphate tal-potassju, KH2PO4, A.R.: 8,5 g

di-potassium mono-hydrogenphosphate, K2HPO4, A.R.: 21,75 g.

It-taħlita sservi kemm bħala nutrijent u kemm bħala sistema ta' *buffering*.

1.6.1.2. L - a p p a r a t

Ir-reċipjenti tal-ħġieġ b'volum ta' litru sa erba' litri (e.ż. ir-reċipjenti ċilindriċi).

L-aġitatur bi strument li jħallat tal-ħġieġ jew tal-metall fuq maqbad adattat (l-istrument li jħallat għandu jdur madwar 5 sa 10 cm fuq il-qiegħ tar-reċipjent). L-istrument li jħallat u li hu manjetiku b' lasta twila minn 7 sa 10 cm tista' tkun użata minflok.

It-tubu tal-ħġieġ ta' 2 sa 4 mm fid-dijametru ta' ġewwa biex tkun introdotta l-arja. Il-ftuħ tat-tubu għandu jkun ta' madwar 1 cm fuq il-qiegħ tar-reċipjent.

ċentrifugu (madwar 3 550 g).

Il-metru tal-pH.

Il-metru ta' l-ossiġnu maħlul.

Il-filtri tal-karta.

▼B

L-apparat tal-filtrazzjoni tal-membran.

Il-filtri tal-membra, il-qies tal-pora ta' 0,45 nm. Il-filtri tal-membran huma adattati jekk huwa żgurat li huma la jerħu l-karbonju u lanqas jassorbu s-sostanza fl-istadju tal-filtrazzjoni.

It-tagħmir analitiku għad-determinazzjoni tal-kontenut tal-karbonju u tad-domanda ta' l-ossiġnu kimiku.

1.6.1.3. Il-preparazzjoni tas-sostanza tat-tilqim

It-tajn oħxon attivat minn pjanta tat-trattament bijoloġiku jiġi maħsul minn (b'mod repettitiv) ċentrifugazzjoni jew tqegħed bl-ilma tat-test (fuq).

It-tajn oħxon attivat għandu jkun f'kondizzjoni adattata. Dan it-tajn huwa disponibbli minn pjanta tat-trattament ta' l-ilma li huwa skart li taħdem tajjeb. Biex jinġabu kemm jista' jkun speċji u razzez differenti ta' batterji, jista' jkun aħjar li titħallat is-sostanza tat-tilqim minn sorsi differenti (e.ż. il-pjanti tat-trattament differenti, l-estratti tal-ħamrija, l-ilma tax-xmara, eċċ.). It-taħlita għandha tkun trattata kif deskritt hawn fuq.

Biex tkun iċċekkjata l-attività tat-tajn oħxon attivat ara "Il-kontroll funzjonali", taħt.

1.6.1.4. Il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test

Żied mar-reċipjent tat-test 500ml ta' l-ilma tat-test, 2,5 ml/litru tas-soluzzjoni nutrijenti u t-tajn oħxon attivat f'ammont li jikkorrispondi għal 0,2 sa 1,0 g/litru ta' materjal niexef fit-taħlita finali. Żied soluzzjoni ta' l-istokk suffiċjenti tas-sostanza li għandha tkun ittestjata biex b'hekk il-konċentrazzjoni DOC ta' 50 sa 400mg/litru tirriżulta fit-taħlita finali. Il-valuri tas-COD korrispondenti huma 100 sa 1 000 mg/litru. Għamel bl-ilma tat-test għall-volum totali ta' litru sa erba' litri. Il-volum totali li għandu jintgħażel huwa dipendenti fuq in-numru ta' kampjuni li għandhom jittieħdu għad-determinazzjoni tad-DOC jew tas-COD u l-volumi neċessarji għall-proċedura analitika.

Normalment il-volum ta' żewġ litri jista' jitqies bħala sodisfaċenti. Minn ta' l-anqas reċipjent wieħed tal-kontroll (vojt) huwa magħmul biex jimxi parallel ma' kull serje tat-test; huwa fih biss tajn oħxon attivat u s-soluzzjoni tan-nutrijenti minerali magħmul bl-ilma tat-test għall-istess volum totali bħal fir-reċipjenti tat-test.

1.6.2. *L-andament tat-test*

Ir-reċipjenti tat-test jiġu aġitati bl-istrumenti li jħalltu li huma manjetiċi jew skrejjen li jinbuttaw taħt illuminazzjoni mxerrda jew f'kamra mdallma f'20 sa 25 °C. L-għoti ta' l-arja huwa miksub bl-arja kompressata mnaddfa b'passatur tas-suf tal-qoton u bi flixkun tal-ħasil jekk ikun neċessarju. Għandu jkun żgurat li t-tajn oħxon ma joqgħodx u l-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu ma taqax taħt iż-2mg/litru.

Il-valur pH għandu jkun iċċekkjat f'intervalli regolari (e.ż. kuljum) u irranġat għal pH 7 sa 8, jekk ikun neċessarju.

▼B

It-telf mill-evaporazzjoni huwa magħmul eżatt qabel kull teħid tal-kampjun bl-ilma dejonizzat jew distillat fl-ammonti meħtieġa. Il-proċedura tajba għandha timmarka l-livell tal-likwidu fuq ir-reċipjent qabel ma jibda t-test. Il-marki l-ġodda huma magħmula wara kull teħid ta' kampjun (mingħajr l-għoti ta' l-arja u t-taħwid). L-ewwel kampjuni huma dejjem meħuda tlett siegħat wara l-bidu tat-test biex b'hekk ikun skopert l-assorbiment tal-materjali tat-test bit-tajn oħxon attivat.

L-eliminazzjoni tal-materjal tat-test huwa segwit bid-determinazzjoni tad-DOC jew tas-COD magħmula kuljum jew f'intervall ieħor regolari. Il-kampjuni mir-reċipjenti tat-test u l-vojt huma ffiltrati minn ġo filtru tal-karti maħsul sew. L-ewwel 5ml tas-soluzzjoni ffiltrata tat-test huma mormija. It-tajn oħxon li huwa diffiċli li tiffiltrah jista' jkun imneħħi qabel biċ-ċentrifugazzjoni għal 10 minuti. Id-determinazzjonijiet tad-DOC u s-COD huma magħmul doppji. It-test huwa magħmul sa 28 ġurnata.

Nota: Il-kampjuni li jibqgħu turpid jiġu ffiltrati minn ġo filtri tal-membran. Il-filtri tal-membran m'għandhom jerħu jew jassorbu xi materjal organiku.

Il-kontroll funzjonali tat-tajn oħxon attivat

Ir-reċipjent li fih sostanza magħrufa għandu jkun magħmul parallel ma' kull serje ta' testijiet biex b'hekk tkun iċċekkjata l-kapaċità funzjonali tat-tajn oħxon attivat. Id-diethyleneglycol kien misjub utli għal dan il-għan.

L-adattament

Jekk l-analiżi huma magħmula f'intervalli relattivament qosra (e.ż. kuljum), l-adattament għandu jkun rikonoxxut b'mod ċar mill-kurva tad-degradazzjoni (ara l-Figura 2). It-test għalhekk m'għandux jibda immedjatament qabel il-weekend.

Jekk l-adattament iseħħ fl-aħħar tal-perjodu, it-test jista' jittawwal sakemm id-degradazzjoni tkun kompleta.

Nota: Jekk tagħrif aktar vast fuq l-aġir tat-tajn oħxon huwa meħtieġ, l-istess tajn oħxon attivat huwa espost darba oħra għall-istess materjal tat-test skond il-proċedura li ġejja:

Itfi l-aġitatur u l-apparat li jagħti l-arja u ħalli t-tajn oħxon attivat joqgħod. Neħħi s-sustanza li tgħum f'wiċċ il-likwidu, imla sa żewġ litri bl-ilma tat-test, ħawwad għal 15-il minuta u ħalliħ jerġa joqgħod. Wara li s-sostanza li tgħum f'wiċċ il-likwidu tkun imneħħija, uża t-tajn oħxon li jibqa biex tirrepeti t-test bl-istess materjal skond 1.6.1.4 u 1.6.2, fuq. It-tajn oħxon attivat jista' wkoll ikun iżolat biċ-ċentrifugazzjoni minfloq bit-tqegħid.

It-tajn oħxon attivat jista' jkun imħallat mat-tajn oħxon frisk għal konċentrazzjoni ta' 0,2 sa 1 g piż niexef/litru.

▼B

Il-mezzi analitiċi

Normalment il-kampjuni jiġu ffiltrati minn ġo passatur tal-karti maħsul sew (għal ħasil uża l-ilma deonizzat).

Il-kampjuni li jibqgħu mdardra jiġu ffiltrati minn ġo filtri tal-membran (0,45 μm).

Il-konċentrazzjoni DOC hija determinata darbtejn fil-filtrati tal-kampjuni (l-ewwel 5ml jiġu mormija) permezz ta' l-istrument tat-TOC. Jekk il-filtrat ma jistax ikun analizzat fl-istess ġurnata, għandu jkun merfugħ fir-refriġeratur sal-ġurnata ta' wara. Irfigħ għal aktar tul ta' żmien ma jistax ikun rakkomandat.

Il-konċentrazzjoni COD hija determinata fil-filtrati tal-kampjuni b'arranġatura analitika tas-COD bil-proċedura deskritta fir-referenza (2), hawn taħt.

2. **ID-DATA UL-VALUTAZZJONI**

Il-konċentrazzjoni tad-DOC u/jew tas-COD huma determinati minn ta' l-anqas darbtejn fil-kampjuni skond 1.6.2 hawn fuq. Id-degradazzjoni fil-ħin T hija kkalkulata skond il-formula (bid-definizzjonijiet) mogħtija taħt 1.2 hawn fuq.

Il-limitu tad-degradazzjoni jiġi mnaqqas jew miżjud għall persentaġġ sħiħ l-aktar qrib. L-ammont tad-degradazzjoni miksub fl-aħħar tat-test huwa rappurtat bħala il-"Biodegradabilità fiz-Zahn – it-test ta' Wellens".

Nota: Jekk id-degredazzjoni kompleta hija miksuba qabel il-ħin tat-test jispiċċa u dan ir-riżultat huwa konfermat b'analiżi oħra fil-ġurnata ta' wara, it-test jista' jkun konkluż.

3. **IR-RAPPORTAGG**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, ikun fih dan li ġej:

— il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza,

— l-informazzjoni l-oħra kollha u r-riżultati sperimentali rigward is-sustanza ttestjata, is-sostanza referenza jekk kienet użata, u l-vojt,

— il-konċentrazzjoni wara tlett siegħat,

— il-kurva tal-biodegradazzjoni bid-deskrizzjoni,

— id-data u l-post fejn l-organiżmi tat-test kienu meħuda, l-istatus ta' l-adattament, il-konċentrazzjoni użata, eċċ.,

— ir-raġunijiet xjentifiċi għal kwalunkwe tibdiliet fil-proċedura tat-test.

3.2. L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

It-tneħħija tad-DOC (COD) li ssir gradwalment fuq medda ta' ġranet jew ġimgħat tindika li s-sustanza tat-test qiegħda tiġi biodegradata.

▼B

Madanakollu, l-assorbiment fiżiko-kimiku jista', f'ċerti każijiet, jilgħab rwol u dan huwa indikat fejn hemm it-tneħħija kompleta jew parzjali mill-bidu nett, fl-ewwel tlett siegħat, u d-differenza bejn il-likuri tal-kontroll u dawk li jgħumu f'wiċċ l-ilma tibqa f'livell baxx li ma jkunx mistenni.

Aktar testijiet huma neċessarji jekk għandu jkun hemm distinzjoni bejn il-biodegradazzjoni (jew il-biodegradazzjoni parzjali) u l-assorbiment.

Dan jista' jkun magħmul f'numru ta' modi, iżda dak l-aktar konvinċenti għandu jkun li tkun użata is-sustanza li tgħum f'wiċċ l-ilma jew it-tajn oħxon bħala sustanza użata għat-tilqim f'test tas-sett bażiku (preferibbilment f'test respirometriku).

Is-sustanzi tat-test li jagħtu tneħħija għolja u li ma tassorbix ta' DOC (COD) fittest għandhom ikunu meqjusa bħala potenzalment biodegradabbli. It-tneħħija parzjali li ma tassorbix tindika li l-kimika hija minn ta' l-anqas soġġetta għal ċerta biodegradazzjoni. It-tneħħija baxxa jew l-ebda tneħħija tad-DOC (COD) tista' tkun kawża ta' l-inibizzjoni tal-mikroorganiżmi mis-sostanza tat-test u dan jista' wkoll ikun mikxuf bil-lisi u t-telf tat-tajn oħxon, li jagħti sostanzi li jgħumu fuq l-ilma li jkunu mdardra. Dan it-test għandu jkun ripetut billi tintuża konċentrazzjoi aktar baxxa tas-sostanza tat-test.

L-użu tal-metodu speċifiku għall-komposti jew tas-sostanza tat-test bit-tikketta 14 C tista' tħalli sensittività aktar għolja. Fil-każ tal-kompost tas-14C tat-test, l-irkuprar tal-14 CO_2 għandu jikkonferma li l-biodegradazzjoni seħħet.

Meta r-riżultati jingħataw fit-termini tal-bijodegradazzjoni primarja, għandha tingħata spjegazzjoni jekk ikun possibbli fuq il-bidla ta' l-istruttura kimika li twassal għal telf fir-rispons tas-sustanza tat-test primarja.

The validation of the analytical method must be given together with the response found on the blank test medium.

4. **IR-REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, Test Guideline 302 B, Id-Deċiżjoni tal-Kunsill C (81) 30 finali.

(2) L-Anness V C.9 Id-Degradazzjoni: Id-Domanda għall-Ossiġnu Kimiku, id-Direttiva tal-Kummissjoni 84/449/KEE, Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Kommunitajiet Ewropej, Nru L 251, 19.9.1984.

▼B

L-Appendiċi:

L-EŻEMPJU TAL-VALUTAZZJONI

Il-kompost organiku:	L-aċidu 4-Ethoxybenzoic
Il-konċentrazzjoni teoretika tat-test:	600 mg/l
Id-DOC teoretiku:	390 mg/l
Is-sostanza tat-tilqim	L-impjant tat-trattament tal-ħmieġ tad-drenaġġ ta'
Il-konċentrazzjoni:	gramma waħda tal-materjal niexef/litru
L-istatus ta' l-adattament:	mhux adattat
L-analiżi:	Id-determinazzjoni tad-DOC
L-ammont tal-kampjuni:	3 ml
Is-sostanza tal-kontroll:	Diethyleneglycol
Il-kompost tat-tossiċità:	L-ebda effetti toxiċi taħt l-1 000 mg It-test użat: Il-fermentazzjoni tat-tubi tat- test

Il-ħin tat-test	Is-sustanza tal-kontroll				Is-sustanza tat-test		
	Id-DOC vojt mg/l	Id-DOC mg/l	Id-DOC nett mg/l	Id-degra-dazzjoni %	Id-DOC mg/l	Id-DOC nett mg/l	Id-degra-dazzjoni %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 siegħat	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ġurnata	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 ġranet	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 ġranet	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 ġranet	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 ġranet	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 ġranet	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 ġranet	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 ġranet	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

▼B

Figura 1

Eżempji tal-kurvi tal-bijodegradazzjoni

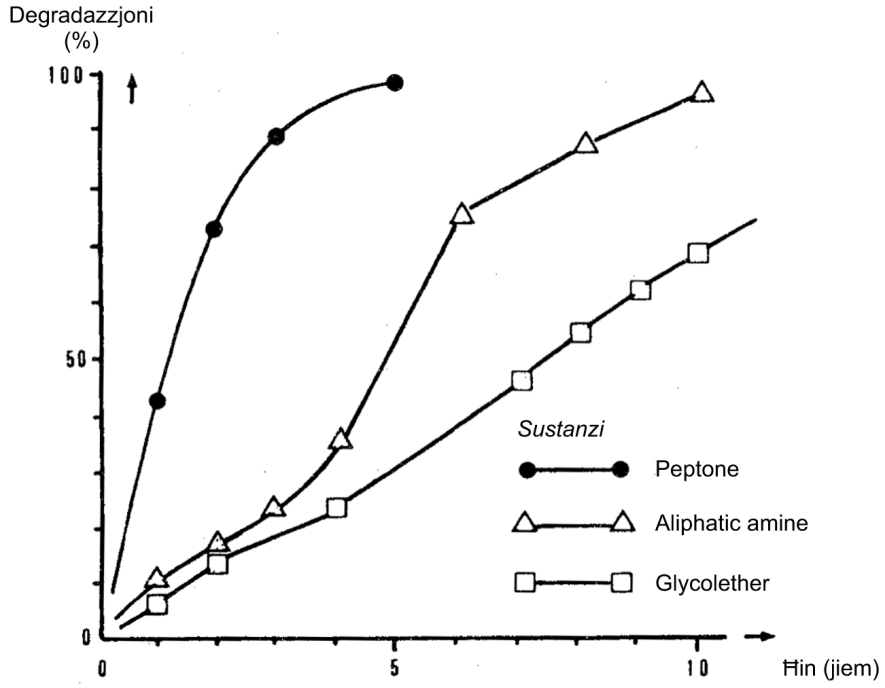
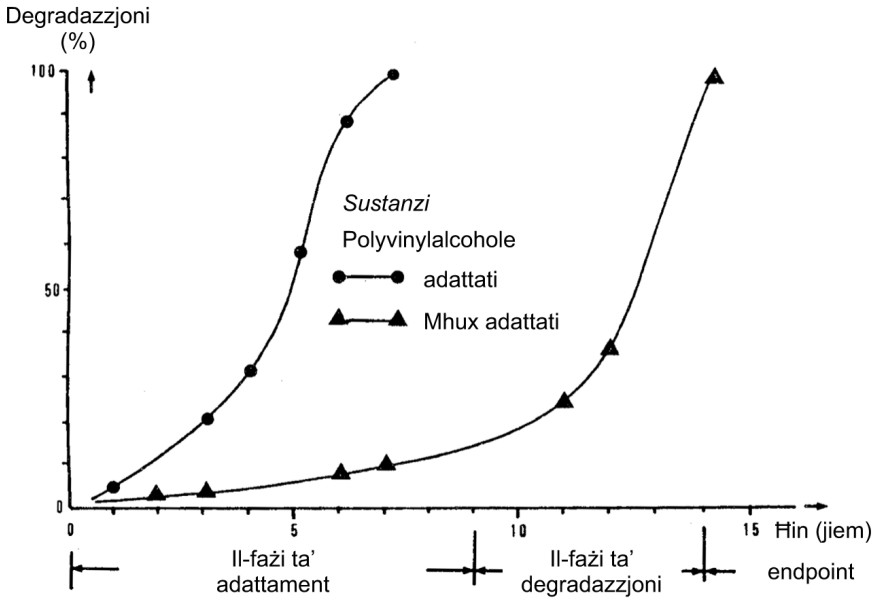


Figura 2

Eżempji ta' l-adattazzjoni tat-tajn oħxon



▼M4

C.10. **TRATTAMENT TA' SIMULAZZJONI TESTAEROBIKA TAD-DRANAĠĠ: C.10-A: UNITAJIET TA' ĦAMA ATTIVAT - C.10-B: BIJORITI**

C.10-A: Unitajiet ta' Ħama Attivat

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 303 (2001) tal-OECD. Fil-ħamsinijiet (1950s) kien irrealizzat li tensjoattivi li kienu għadhom kif ġew introdotti kienu jikkawżaw raġħwa eċċessiva f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi u fix-xmajjar. Ma kinux tneħħew għalkollox fit-trattament aerobiku u f'xi każijiet kienu llimitaw it-tneħħija ta' materja organika oħra. Dan ġiegħel li jsiru ħafna investigazzjonijet dwar kif setgħu jitneħħew tensjoattivi minn ilmijiet mormija u jekk kimiċi ġodda prodotti mill-industrija setgħux ikunu ttrattati b'ilma mormi. Biex dan isir, intużaw unitajiet mudelli li kienu jirrappreżentaw iż-żewġ tipi ewlenin ta' trattament aerobiku u bijoloġiku ta' ilma mormi (ħama attivat u jnixxi, jew iqattar, jiffiltra). Ma kienx ikun prattikabbli u kien jiswa ħafna li kull kimika ġdida titqassam u li jsir monitoraġġ ta' impjanti tat-trattament ta' skala kbira, anki fuq bażi lokali.

KONSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

Unitajiet ta' ħama attivat

2. Unitajiet mudell ta' ħama attivat ġew deskritti li jvarjaw fid-daqs minn 300 ml sa madwar 2 000 ml. Uħud imitaw ħafna l-impjanti ta' skala reali, li jkollhom tankijiet li fihom toqgħod il-ħama fejn il-ħama li jkun qagħad jiġi ppumpjat lura fit-tank tal-arja, filwaqt li oħrajn ma pprovdewx faċilitajiet tat-tqegħid, eż. Swisher (1). Id-daqs tal-apparat huwa kompromess: minn naħa waħda għandu jkun kbir biżżejjed biex l-operazzjoni mekkanika tirnexxi u biex ikun ipprovdut volum suffiċjenti ta' kampjuni mingħajr ma tintlaqat l-operazzjoni; filwaqt li minn naħa oħra l-apparat m'għandux ikun daqshekk kbir li jkun jeħtieġlu spazju u materjali eċċessivi.

3. Żewġ għamliet ta' apparat li ntużaw b'mod estensiv u sodisfaċenti huma l-unitajiet Husmann (2) u l-unitajiet ta' Borma Poruża (3)(4), tal-ewwel użati fl-istudju ta' tensjoattivi; dawn huma deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar. Oħrajn intużaw ukoll b'mod sodisfaċenti, eż. Eckenfelder (5). Minħabb li kienu jiswew relattivament ħafna u minħabba l-isforz li kien meħtieġ biex ikun applikat dan it-test ta' simulazzjoni, kienu mistħarrġa fl-istess żmien testijiet ta' tgħarbil aktar sempliċi u orħos, li issa jinsabu inkorporati fil-kapitolu C.4 A-F ta' dan l-Anness (6). L-esperjenza minn ħafna tensjoattivi u kimiċi oħra wriet li dawk li għaddew mit-testijiet tat-tgħarbil (bijodegradabbli faċilment) iddegradaw ukoll fit-test ta' simulazzjoni. Xi wħud minn dawk li m'għaddewx mit-testijiet tat-tgħarbil għaddew mit-testijiet tal-bijodegradabbiltà inerenti (il-Kapitoli C.12 (7) u C.19 (8) ta' dan l-Anness), iżda ftit biss minn dan il-grupp tal-aħħar kienu ddegradati fit-test ta' simulazzjoni, filwaqt li dawk il-kimiċi li m'għaddewx minn testijiet għall-bijodegradabbiltà inerenti ma ddegradawx fit-testijiet ta' simulazzjoni (9)(10)(11).

4. Għal xi għanijiet, testijiet ta' simulazzjoni mwettqin skont sett wieħed ta' kondizzjonijiet operazzjonali jkunu suffiċjenti; ir-riżultati jkunu espressi bħala perċentwali ta' tneħħija tal-kimika għall-ittestjar jew tal-karbonju organiku maħlul (DOC). Deskrizzjoni ta' test bħal dan tingħata f'dan il-Metodu ta' Ttestjar. Iżda, mhux bħal verżjoni ta' qabel ta' dan il-Kapitolu, li ddeskriviet tip wieħed biss ta' apparat li jittratta dranaġġ sintetiku fil-modalità akkoppjata bl-użu ta' metodu relattivament primittiv ta' rimi ta' ħama,

▼M4

dan it-test joffri għadd ta' varjazzjonijiet. Huma deskritti alternattivi għat-tip ta' apparat, modalità ta' tħaddim, dranaġġ u tneħħija ta' rimi ta' ħama. Dan it-test isegwi mill-qrib dak ta' ISO 11733 (12), li kien eżaminat bir-reqqa matul it-tħejjija tiegħu, għalkemm il-metodu ma tqiegħedx għal ringtest.

5. Għal għanijiet oħra, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent jeħtiġilha tkun magħrufa b'aktar akkuratezza u għal dan jeħtieġ metodu aktar estensiv. Pereżempju, ir-rata ta' rimi ta' ħama għandha tkun ikkontrollata b'mod aktar preċiż tul kull ġurnata u tul il-perjodu tat-test, u unitajiet għandhom jitħaddmu f'għadd ta' rati ta' rimi. Għal metodu għal kollox komprensiv, testijiet għandhom isiru wkoll f'żewġ jew fi tliet temperaturi differenti: metodu bħal dan huwa deskritt minn Birch (13)(14) u huwa miġbur fil-qosor fl-Appendiċi 6. Iżda t-tagħrif li għandna preżentament mhux suffiċjenti biex ikun deċiż liema mill-mudelli kinetiċi huma applikabbli għall-bijodegradazzjoni ta' kimiċi fi trattament ta' ilma mormi u ġeneralment fl-ambjent akwatiku. L-applikazzjoni tal-kinetika Monod, mogħtija fl-Appendiċi 6 bħala eżempju, hija limitata għal kimiċi li jkun hemm f'1 mg/l u msemmija hawn fuq, iżda l-opinjoni ta' xi whud hija li anki din fadlilha tkun issustanzjata. Testijiet f'konċentrazzjonijiet li jirriflettu aktar tassew dawk misjubin f'ilmijiet mormija huma indikati fl-Appendiċi 7, iżda testijiet bħal dawn, u dawk fl-Appendiċi 6, huma inklużi f'Appendiċijiet minflok ma jinħarġu bħala Metodi ta' Ttestjar separati.

Filtri

6. Ingħatat anqas attenzjoni lil filtri mudelli li jnixxu, forsi minħabba li huma aktar skomdi u anqas kompatti minn mudelli ta' impjanti ta' ħama attivat. Gerike *et al* żviluppaw unitajiet tal-filtri jnixxu (trickling) u operawhom fil-mod akkoppjat ((15). Dawn il-filtri kienu relattivament kbar (għoli ta' 2 m; volum ta' 60 l) u kull wieħed kien jirrikjedi sa 2 l/h ta' dranaġġ. Baumann et al (16) issimulaw il-filtri li jnixxu billi daħħlu strixxi tal-polyester "fleece" f'tubi ta' 1 m (dijametru intern ta' 14 mm) wara li l-istrixxi ddaħħlu fil-ħama attivata konċentrata għal 30 minuta. Il-kimika għall-ittestjar bħala sors uniku ta' C f'soluzzjoni ta' mluħa minerali tferrat minn tubu vertikali u l-bijodegredazzjoni ġiet ivvalutata minn kejlijiet ta' DOC fl-effluwent u d-CO_2 fil-gass li ħareġ.

7. Biofiltri kienu ssimulati mod ieħor (15); l-uċuħ ta' ġewwa ta' tubi li jduru, inklinati f'angolu żgħir mal-orizzontali, tqegħdilhom dranaġġ (madwar 250 ml/h) bi u mingħajr il-kimika għall-ittestjar, u l-effluwenti miġbura kienu analizzati għal DOC u/jew għall-kimika speċifika tat-test.

PRINĊIPJU TA' TTESTJAR

8. Dan il-metodu huwa mfassal biex ikunu ddeterminati l-eliminazzjoni u l-bijodegradazzjoni primarja u/jew finali ta' kimiċi organiċi li jinħallu fl-ilma b'mikroorganiżmi aerobiċi f'sistema ta' ttestjar imħaddma kontinwament li tissimula l-proċess ta' ħama attivat. Miġjum organiku faċilment bijodegradabbli u l-kimika organika tat-test huma s-sorsi ta' karbonju u enerġija għall-mikroorganiżmi.

9. Żewġ unitajiet ta' ttestjar imħaddmin kontinwament (impjanti ta' ħama attivat jew borom poruži) jintużaw fl-istess waqt f'kondizzjonijiet identiċi li jintgħażlu biex ikunu adatti għall-fini tat-test. Normalment il-ħin medju ta' retenzjoni idrawlika jkun ta' 6 sigħat u l-ħama jkollu żmien medju (żmien ta' retenzjoni ta' ħama) ta' minn 6 sa 10 ijiem. Il-ħama jintrema b'wieħed minn żewġ metodi, il-kimika għall-ittestjar normalment tiżdied f'konċentrazzjoni ta' bejn 10 mg/l ta' karbonju organiku maħlul (DOC) u 20 mg/l DOC, mal-influwent (miġjum organiku) ta' waħda biss mill-unitajiet. It-tieni unità tintuża bħala unità ta' kontroll biex tkun iddeterminata l-bijodegradazzjoni tal-miġjum organiku.

▼M4

10. F’kampjuni meħudin sikwit tal-effluwenti, ikun iddeterminat id-DOC, preferibbilment, jew id-domanda kimika ta’ ossiġnu (COD), flimkien mal-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (jekk ikun meħtieġ) b’analiżi speċifika, fl-effluwent mill-unità li tirċievi l-kimika għall-ittestjar. Id-differenza bejn il-konċentrazzjonijiet ta’ effluwenti ta’ DOC jew ta’ COD fl-unitajiet ta’ ttestjar u ta’ kontroll hija preżunta li tkun dovuta minħabba l-kimika għall-ittestjar jew il-metaboliti organiċi tagħha. Din id-differenza titqabbel mal-konċentrazzjoni ta’ influwenti ta’ DOC jew ta’ COD minħabba kimika għall-ittestjar miżjuda biex tkun iddeterminata l-eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

11. Il-bijodegradazzjoni tista’ normalment tingħaraf minn bijosorbiment b’eżami sewwa tal-kurva ta’ eliminazzjoni-żmien/ħin u tista’ s-soltu tkun ikkonfermata bl-applikazzjoni ta’ test għal bijodegradazzjoni faċli billi tintuża tilqima akklimatizzata mill-unità li tirċievi l-kimika għall-ittestjar.

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR

12. Il-purezza, is-solubilità fl-ilma, il-volatilità u l-karatteristiċi ta’ sorbiment tal-kimika għall-ittestjar għandhom ikunu magħrufin biex tkun tista’ ssir interpretazzjoni korretta ta’ riżultati. Normalment kimiċi volatili u li ma jinħallux ma jistgħux ikunu ttestjati sakemm ma jitteħdux prekawzjonijiet speċjali (ara l-Appendiċi 5). L-istruttura kimika, jew tal-anqas il-formula empirika, ukoll għandhom ikunu magħrufin biex ikunu kkalkulati valuri teoretiċi u/jew biex ikunu vverifikati valuri mkejla ta’ parametri, eż. domanda teoretika ta’ ossiġnu (ThOD), karbonju organiku maħlul (DOC) u domanda kimika ta’ ossiġnu (COD).

13. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganiżmi (ara l-Appendiċi 4) tista’ tkun utli biex jintgħażlu konċentrazzjonijiet tat-test adatti u tista’ tkun essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta’ valuri baxxi ta’ bijodegradazzjoni.

LIVELLI TA’ PASS

14. Fl-applikazzjoni oriġinali ta’ dan it-test ta’ simulazzjoni (konfermatorju) għall-bijodegradazzjoni primarja ta’ tensjoattivi, tkun meħtieġa tneħħija ta’ aktar minn 80 % tal-kimika speċifika qabel ma t-tensjoattiv jitqiegħed fis-suq. Jekk il-valur ta’ 80 % ma jintlaħaqx, jista’ jkun applikat dan it-test ta’ simulazzjoni (konfermatorju) u t-tensjoattiv ikun jista’ jitqiegħed fis-suq biss jekk titneħħa aktar minn 90 % tal-kimika speċifika. Għal kimiċi inġenerali mhix kwistjoni ta’ jekk ikunx hemm pass/falliment u l-valur ta’ perċentwali ta’ tneħħija miksub jista’ jintuża f’kalkulazzjonijiet prossimi tal-konċentrazzjoni ambjentali probabbli biex jintuża fi stimi tal-perikli li jġibu kimiċi. Riżultati aktarx isegwu xejra ta’ kollox jew xejn. F’għadd ta’ studji tal-kimiċi puri l-perċentwali ta’ tneħħija ta’ DOC instab li kien > 90 % f’aktar minn tliet kwarti u > 80 % f’aktar minn 90 % tal-kimiċi li wrew xi grad sinifikanti ta’ bijodegradabbiltà.

15. Relattivament ftit kimiċi (eż. tensjoattivi) jinsabu fid-dranaġġ fil-konċentrazzjonijiet (madwar 10 mg C/l) użati f’dan it-test. Xi kimiċi jistgħu jkunu inibitorji f’dawn il-konċentrazzjonijiet, filwaqt li l-kinetika ta’ tneħħija ta’ oħrajn tista’ tkun differenti f’konċentrazzjonijiet baxxi. Tista’ ssir valutazzjoni aktar akkurata tad-degradazzjoni billi jintużaw metodi modifikati, bl-użu ta’ konċentrazzjonijiet realistikament baxxi tal-kimika għall-ittestjar, u d-dejta miġbura tkun tista’ tintuża biex ikunu kkalkulati kostanti kinetiċi. Iżda t-tekniki sperimentali meħtieġa għadhom ma ġewx ivvalidati għalkollox u lanqas ma għadhom ġew stabbiliti l-mudelli kinetiċi li jiddeskrivu r-reazzjonijiet ta’ bijodegradazzjoni (ara l-Appendiċi 7).

▼M4

KIMIĊI TA' REFERENZA

16. Biex ikun żgurat li l-proċedura sperimentali tkun qed titwettaq b'mod korrett, ikun utli kull tant żmien li jkunu ttestjati l-kimiċi li l-imġiba tagħhom tkun magħrufa fl-istess waqt meta jkunu mistħarġa l-kimiċi għall-ittestjar. Kimiċi bħal dawn jinkludu aċidu adipiku, 2-fenil fenol, 1-naftol, aċidu difeniku, 1-aċidu naftoiku, eċċ. (9)(10)(11).

RIŻULTATI RIPRODUĊIBBLI TA' TESTIJIET

17. Kien hemm bil-wisq anqas rapporti ta' studji ta' testijiet ta' simulazzjoni milli ta' testijiet għal bijodegradabbiltà faċli. Riproduċibbiltà bejn replikati (simultanji) hija tajba (f'10-15 %) għall-kimiċi għall-ittestjar iddegradati bi 80 % jew aktar, iżda għall-kimiċi anqas iddegradati sewwa l-varjabbiltà hija akbar. Ukoll għal xi kimiċi dubjużi kienu rreġistrati riżultati differenti għal-kollox minn xulxin (eż. 10 %, 90 %) f'okkażjonijiet differenti fi żmien 9 ġimgħat permessi fit-test.

18. Ftit instabet differenza f'riżultati miksubin biż-żewġ tipi ta' apparat, iżda xi kimiċi kienu aktar iddegradati b'mod estensiv u konsistenti meta kien hemm dranaġġ domestiku milli minn dranaġġ sintetiku tal-OECD.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Apparat

Sistema ta' ttestjar

19. Is-sistema ta' ttestjar għal kimika waħda ta' ttestjar tikkonsisti minn unità ta' ttestjar u minn unità ta' kontroll; iżda meta ssir analiżi speċifika waħda (bijodegradazzjoni primarja), tkun meħtieġa biss unità ta' ttestjar. Tista' tintuża unità waħda ta' kontroll għal diversi unitajiet ta' ttestjar li jirċievu l-kimiċi għall-ittestjar li jkunu l-istess jew differenti. Fil-każ ta' akkoppjar (Appendiċi 3) kull unità ta' ttestjar għandu jkollha unità ta' kontroll tagħha stess. Is-sistema ta' ttestjar tista' tkun jew ta' mudell ta' impjant ta' ħama attivat, unità Husmann (Appendiċi 1, Figura 1) jew borma poruża (Appendiċi 1, Figura 2). Fiż-żewġ każijiet ikunu meħtieġa reċipjenti ta' ħżin ta' daqs suffiċjenti għall-influwenti u l-effluwenti, kif ukoll pompi biex jiddożaw l-influwent, mħallat ma' soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar jew b'mod separat.

20. Kull unità ta' impjant ta' ħama attivat tikkonsisti minn reċipjent ta' tirwiħ b'kapaċità magħrufa ta' madwar 3 litri ta' ħama attivat u li jkollu separatur (kjarifikatur sekondarju) li jkun jesa madwar 1,5 litri; il-volumi jistgħu, sa ċertu punt, jinbidlu billi jkun aġġustat l-għoli tas-separatur. Reċipjenti ta' daqs differenti jkunu permissibbli jekk jitħaddmu b'piżijiet idrawliċi komparabbli. Jekk ma jkunx possibbli li t-temperatura fil-kamra tat-test tinżamm fil-firxa mixtieqa, huwa rrakkomandat li jintużaw reċipjenti mdawrin bl-ilma b'temperatura kontrollata. Tintuża pompa ta' estrazzjoni bl-arja jew pompa tad-dożar biex tirriċikla l-ħama attivat mis-separatur għar-reċipjent ta' tirwiħ, kontinwament jew kull tant f'intervalli regolari.

21. Is-sistema ta' borma poruża tikkonsisti minn ċilindru fuq ġewwa, poruż b'qiegħ koniku miżmum f'reċipjent ftit akbar tal-istess forma, iżda li jkun magħmul minn materjal tal-plastik li minnu ma jgħaddix l-ilma. Materjal adatt għar-reċipjent poruż huwa l-polietilen poruż b'pori ta' daqs massimu ta' 90 μm u ħoxnin 2 mm. Is-separazzjoni tal-ħama mill-midjum organiku ttrattat issir b'passaġġ differenzjali minn naħa għal oħra tal-ħajt poruż. Effluwenti jinġabru fl-Ispazju annulari minn fejn ifuru għal ġor-reċipjent tal-ġbir. Ma jkun hemm ebda ħama qiegħed u, għalhekk, ma jiġix ħama lura. Is-sistema

▼M4

kollha tista' titrikkeb f'banjumarija kkontrollat termostatikament. Borom poruži jisfaw miżdudin u jistgħu jfuru fl-istadji tal-bidu. F'każ bħal dan, ibdel l-inforra poruża b'waħda nadifa billi l-ewwel tgħaddi minn ġo sifun il-ħama mill-borma għal ġo barmil nadif u tneħħi l-inforra miżduda. Wara li timsaħ sewwa ċ-ċilindru estern li minnu ma jgħaddix l-ilma, daħħal inforra nadifa u erġa' qiegħed il-ħama fil-borma. Xi ħama li jeħel mal-ġnub tal-inforra miżduda jitqaxxar bil-galbu u jittieħed band'oħra. L-ewwel naddaf il-borom miżduda billi tuża ġett irqiq ta' ilma biex tneħħi l-ħama li jkun fadal u billi tgħaddashom f'soluzzjoni dilwita ta' ipoklorit tas-sodju, mbagħad fl-ilma, u wara laħlaħ sewwa bl-ilma.

22. Għal tirwiħ tal-ħama fir-reċipjenti ta' tirwiħ taż-żewġ sistemi, jeħtieġu tekniki adatti, pereżempju kubi sinterizzati (ġebel diffuż) u arja kkompressata. L-arja għandha titnaddaf, jekk ikun meħtieġ, billi tgħaddi minn filtru adatt u tinħasel. Mis-sistema għandha tgħaddi arja suffiċjenti biex jinżammu kondizzjonijiet aerobiċi u biex partiċelli ta' ħama jinżammu f'sospensjoni l-ħin kollu.

Apparat ta' filtrazzjoni jew ċentrifugu

23. Ikun hemm apparat għall-filtrazzjoni ta' kampjuni b'filtri ta' membrani ta' porożità adatta (dijametru ta' apertura nominali ta' 0,45 μm) li jassorbixxu l-kimiċi organiċi li jinħallu u jerħu karbonju organiku fi grad minimu. Jekk jintużaw filtri li jerħu karbonju organiku, aħsel il-filtri sewwa b'ilma sħun biex tneħħi karbonju organiku li jlissi. Alternattivament jista' jintuża ċentrifugu li jkun kapaċi jipproduċi 40 000 m/s^2.

Tagħmir analitiku

24. Apparat meħtieġ biex ikun iddeterminat:

— DOC (karbonju organiku maħlul) u TOC (karbonju organiku totali) jew COD (domanda kimika ta' ossiġnu);

— kimika speċifika, jekk tkun meħtieġa;

— solidi sospiżi, pH, konċentrazzjoni tal-ossiġnu fl-ilma;

— temperatura, aċidità u alkalinità;

— ammonju, nitrit u nitrat, jekk it-test isir f'kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni.

Ilma

25. Ilma tal-vit, li jkun fih anqas minn 3 mg/l DOC. Iddetermina l-alkalinità jekk mhix6magħrufa diġà.

26. Ilma dejonizzat, li jkun fih anqas minn 2 mg/l ta' DOC.

Midjum organiku

27. Dranaġġ sintetiku, dranaġġ domestiku jew taħlita tat-tnejn huma permissibbli bħala l-midjum organiku. Intwera (11)(14) li l-użu ta' dranaġġ domestiku waħdu sikwit jagħti perċentwali miżjud ta' tneħħija ta' DOC u anki jippermetti t-tneħħija u l-bijodegradazzjoni ta' xi kimiċi li ma jkunux iddegradati bijoloġikament meta jintuża dranaġġ sintetiku tal-OECD. Barra dan, il-kostant jew iż-żieda kull tant ta' dranaġġ domestiku sikwit jagħmlu stabbli l-ħama attivat, inkluża l-kapaċità kruċjali li joqgħod sewwa. Għalhekk huwa rrakkomandat l-użu ta' dranaġġ domestiku. Kejjel il-konċentrazzjoni ta' DOC jew ta' COD f'kull lott ġdid ta' midjum organiku. L-aċidità jew l-alkalinità tal-midjum organiku għandha tkun magħrufa. Il-midjum organiku jista' jkun jeħtieġlu li jiżdiedlu lqugħ xieraq (idroġenu karbonat tas-sodju jew fosfat tal-potassju tad-diidroġenu) jekk ikun ta' aċidità jew alkalinità baxxa, biex jinżamm pH ta' madwar 7,5 ± 0,5 fir-reċipjent ta' tirwiħ matul it-test. Kemm ikollu jiżdied ilqugħ, u meta jkollu jiżdied, għandu jkun deċiż għal kull każ għalih waħdu. Meta jintużaw taħlitiet kontinwament jew kull tant, DOC (jew COD) tat-taħlita għandu jinżamm bejn wieħed u ieħor f'valur kostanti, eż. b'dilwizzjoni bl-ilma.

▼M4

Dranaġġ sintetiku

28. Ħoll f'kull litru ta' ilma tal-vit: peptun, 160 mg; estratt tal-laħam, 110 mg; urea, 30 mg; fosfat anidru tal-idroġenu tad-dipotassju (K_2HPO_4), 28 mg; klorur tas-sodju (NaCl), 7 mg; diidrat tal-klorur tal-kalċju ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; ettaidrat tas-sulfat tal-manjeżju (($Mg_2SO_4.7H_20$), 2 mg. Dan id-dranaġġ sintetiku tal-OECD huwa eżempju u jagħti konċentrazzjoni medja tad-DOC fl-influwent ta' madwar 100 mg/l. Alternattivament, uża kompożizzjonijiet oħrajn, b'madwar l-istess konċentrazzjoni tad-DOC, li huma eqreb għall-ħama reali. Jekk ikun meħtieġ influwent inqas konċentrat, iddilwixxi d-dranaġġ sintentiku, pereżempju 1:1 bl-ilma tal-vit biex tikseb konċentrazzjoni ta' maddwar 50 mg/l. Influwent iktar dgħajjef bħal dan se jippermetti tkabbir aħjar tal-organiżmi li jinnitrifikaw u din il-modifika għandha tintuża jekk is-simulazzjoni tal-impjanti tal-ilma mormi li jinnitrifikaw għadnha tiġi investigata. Dan id-dranaġġ sintetiku jista' jsir f'ilma distillat f'forma konċentrata u jinħażen f'madwar 1 °C sa mhux aktar minn ġimgħa. Meta jkun hemm bżonnu, raqqu bl-ilma tal-vit. (Dan il-midjum mhux sodisfaċenti, eż. il-konċentrazzjoni ta' nitroġenu hija għolja ħafna, relattivament b'kontenut ta' karbonju baxx, iżda ma kien issuġġerit xejn aħjar, ħlief li jiżdied aktar fosfat bħala lqugħ u peptun żejjed).

Dranaġġ domestiku

29. Uża dranaġġ qiegħed frisk miġbur kuljum minn xogħlijiet ta' trattament li jirċievu b'mod predominanti dranaġġ domestiku. Dan għandu jinġabar, qabel sedimentazzjoni primarja, mill-kanal tat-tifwir tat-tank ta' sedimentazzjoni primarja, jew mill-għalf għall-impjant tal-ħama attivat, u jkun kważi kollu ħieles minn partiċelli raffi. Id-dranaġġ ikun jista' jintuża wara l-ħżin għal diversi jiem (iżda ġeneralment m'għandhomx jinqabżu sebgħat ijiem) f'madwar 4 °C, jekk ikun ippruvat li DOC (jew COD) ma jkunux naqsu b'mod sinifikanti (jiġifieri b'anqas minn 20 %) matul il-ħżin. Biex ikun illimitat taqlib fis-sistema, DOC (jew COD) ta' kull lott ġdid għandhom ikunu aġġustati qabel ma jintużaw għal valur kostanti xieraq, eż. b'dilwizzjoni bl-ilma tal-vit.

Ħama attivat

30. Iġbor ħama attivat għal tilqim mit-tank ta' tirwiħ ta' impjant imħaddem tajjeb ta' trattament ta' ilma mormi jew mil-laboratorju unità ta' skala ta' ħama attivat, li tittratta l-aktar dranaġġ domestiku.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar

31. Għall-kimiċi li jinħallu b'mod adegwat, ħejji soluzzjonijiet ta' stokkijiet f'konċentrazzjonijiet xierqa (eż. 1 sa 5 g/l) f'ilma dejonizzat, jew fil-porzjon minerali tad-dranaġġ sintetiku. (għall-kimiċi li ma jinħallux u li jkunu volatili, ara l-Appendiċi 5). Iddetermina d-DOC u karbonju organiku totali (TOC) tas-soluzzjoni ta' stokkijiet u tenni l-kejlijiet għal kull lott ġdid. Jekk id-differenza bejn DOC u TOC tkun aktar minn 20 %, ivverifika jekk il-kimika għall-ittestjar tinħallx fl-ilma. Qabbel id-DOC jew il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar imkejla b'analiżi speċifika tas-soluzzjoni ta' stokkijiet mal-valur nominali, biex taċċerta jekk l-irkupru jkunx tajjeb biżżejjed (normalment jista' jkun mistenni li jkun > 90 %). Aċċerta, l-aktar għal tixrid, jekk jistax jintuża DOC jew le bħala parametru analitiku jew jekk tistax tintuża biss teknika analitika b'mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar. Ċentrifugazzjoni tal-kampjuni tkun meħtieġa għal tixrid. Għal kull lott ġdid, kejjel DOC, COD jew il-kimika għall-ittestjar ma' analiżi speċifika.

▼M4

32. Iddetermina pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Valuri estremi jindikaw li ż-żieda tal-kimika jista' jkollha influwenza fuq pH tal-ħama attivat fis-sistema ta' ttestjar. F'dan il-każ innewtralizza s-soluzzjoni ta' stokkijiet biex tikseb pH ta' 7 ± 0,5 b'ammonti żgħar ta' aċidu jew bażi inorganiċi, iżda evita l-preċipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

PROĊEDURA

33. Il-proċedura hija deskritta għall-unitajiet ta' impjanti ta' ħama attivat; għandha tkun adattata xi ftit għas-sistema tal-borma poruża.

Tħejjija tat-tilqima

34. Laqqam is-sistema ta' ttestjar fil-bidu tat-test bil-ħama attivat jew b'tilqima li jkun fiha konċentrazzjoni baxxa ta' mikroorganiżmi. Żomm it-tilqima mrewħa f'temperatura ambjentali sakemm tintuża u użaha f'ħin ta' 24 siegħa. Fl-ewwel każ, ħu kampjun ta' ħama attivat mit-tank ta' tirwiħ ta' impjant bijoloġiku mħaddem b'mod effiċjenti ta' trattament ta' ilma mormi, jew ta' impjant laboratorju ta' trattament, li jirċievi b'mod predominanti dranaġġ domestiku. Jekk kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni jkollhom ikunu ssimulati, ħu ħama minn impjant ta' nitrifikazzjoni ta' trattament ta' ilma mormi. Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi u, jekk ikun meħtieġ, ikkonċentra l-ħama billi tħallieh joqgħod biex il-volum miżjud mas-sistema ta' ttestjar ikun minimu. Żgura li konċentrazzjoni tal-bidu ta' materja niexfa tkun madwar 2,5 g/l.

35. Fit-tieni każ, uża 2 ml/l sa 10 ml/l ta' effluwent minn impjant bijoloġiku domestiku ta' trattament ta' ilma mormi bħala tilqima. Biex tieħu kemm jista' jkun ħafna speċijiet differenti ta' batterja, jista' jkun ta' għajnuna jekk iżżid tilqimiet minn diversi sorsi oħra, pereżempju ilma tal-wiċċ. F'dan il-każ, il-ħama attivat għandu jiżviluppa u jikber fis-sistema ta' ttestjar.

Dożaġġ ta' midjum organiku

36. Żgura li kontenituri ta' influwenti u effluwenti u tubi minn reċipjenti ta' influwenti u għal reċipjenti ta' effluwenti jitnaddfu sewwa biex tneħħi tkabbir mikrobiku fil-bidu u matul it-test kollu. Iġbor flimkien is-sistemi ta' ttestjar f'kamra fejn it-temperatura tkun ikkontrollata (normalment fil-firxa ta' 20-25 C) jew uża unitajiet ta' ttestjar imdawrin bl-ilma. Ħejji volum suffiċjenti tal-midjum organiku meħtieġ (paragrafi 27-29). Fil-bidu imla r-reċipjent ta' tirwiħ u s-separatur bil-midjum organiku u żid it-tilqima (paragrafi 34, 35). Ibda t-tirwiħ b'mod li l-ħama jinżamm f'sospensjoni u fi stat aerobiku u ibda ddoża l-influwent u rriċikla l-ħama qiegħed. Iddoża l-midjum organiku barra mir-reċipjenti ta' ħżin għal ġor-reċipjenti ta' tirwiħ (paragrafi 20, 21) tat-test u kkontrolla unitajiet u iġbor l-effluwenti rispettivi f'reċipjenti simili ta' ħżin. Biex iġġib il-ħin normali ta' ritenzjoni idrawlika ta' 6h, il-midjum organiku jiġi ppumpjat f'0,5 l/h. Biex tikkonferma din ir-rata, kejjel l-ammont ta' kuljum tal-midjum organiku ddożat billi tieħu nota tat-tnaqqis fil-volumi tal-midjum fil-kontenituri tal-ħżin. Modalitajiet oħra ta' dożar ikunu meħtieġa biex ikunu ddeterminati l-effetti ta' meta jkun hemm reħi kull tant u tagħbija "ħasda" tal-kimiċi.

37. Jekk il-midjum organiku jitħejja biex jintuża għal perjodu itwal minn jum wieħed (1), ikunu meħtieġa tkessiħ f'madwar 4 °C jew metodi oħra adatti ta' konservazzjoni biex ma jitħalliex ikun hemm tkabbir mikrobiku u bijodegradazzjoni 'l barra mill-unitàjiet ta' ttestjar (paragrafu 29). Jekk jintuża dranaġġ sintetiku, ikun possibbli titħejja, u tinħażen f'madwar 4 °C, soluzzjoni konċentrata ta' stokkijiet (eż. 10 darbiet il-konċentrazzjoni normali, paragrafu 28). Din is-soluzzjoni ta' stokkijiet tista' titħallat sewwa mal-volum adatt ta' ilma tal-vit qabel ma tintuża; alternattivament, tista' tkun ippumpjata direttament waqt li l-ammont adatt ta' ilma tal-vit ikun ippumpjat separatament.

▼M4

Dożaġġ tal-kimika għall-ittestjar

38. Żid volum adatt tas-soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar (paragrafu 31) fir-reċipjent ta' ħżin tal-influwent jew iddożah direttament b'pompa separata għal ġor-reċipjent ta' tirwiħ. Il-konċentrazzjoni medja normali tal-ittestjar fl-influwent għandha tkun bejn10 mg/l u 20 mg/l DOC, bil-konċentrazzjoni ta' fuq ta' mhux iktar minn 50 mg/l. Jekk is-solubilità fl-ilma tal-kimika għall-ittestjar tkun baxxa jew jekk aktarx iseħħu effetti tossiċi, naqqas il-konċentrazzjoni għal 5 mg/l DOC jew anki anqas, iżda biss jekk ikun hemm u jitwettaq metodu analitiku speċifiku adatt (jistgħu jiżdiedu l-kimiċi għall-ittestjar imxerrdin li ftit jinħallu fl-ilma billi jintużaw tekniki speċjali ta' dożar, ara l-Appendiċi 5).

39. Ibda żid il-kimika għall-ittestjar wara perjodu li fih is-sistema tkun saret stabbli u tkun qed tneħħi DOC tal-midjum organiku b'mod effiċjenti (madwar 80 %). Huwa importanti li tara li l-unitajiet kollha jkunu qed jaħdmu l-istess b'mod effiċjenti qabel ma tiżdied kimika għall-ittestjar; jekk ma jkunux, is-soltu jkun ta' għajnuna li ħama jitħallat ma' ieħor u li jerġgħu jitqassmu volumi ndaqs lil unitajiet individwali. Meta tintuża tilqima ta' (madwar) 2,5 g/l (piż fin-niexef) ta' ħama attivat, il-kimika għall-ittestjar tista' tiżdied mill-bidu tat-test minħabba li żieda diretta ta' aktar ammonti mill-bidu għandha l-vantaġġ li l-ħama attivat ikun jista' jadatta aħjar għall-kimika għall-ittestjar. Ikun x'ikun il-mod li bih il-kimika għall-ittestjar tiżdied, huwa rrakkomandat li r-rata rilevanti ta' fluss u/jew il-volumi fir-reċipjent(i) ta' ħżin jitkejlu f'intervalli regolari.

Maniġġar ta' ħama attivat

40. Il-konċentrazzjoni ta' solidi ta' ħama attivat normalment issir stabbli bejn limiti matul it-test, b'mod indipendenti mit-tilqima użata, fil-firxa ta' 1 sa 3 g/l (piż fin-niexef) skont il-kwalità u l-konċentrazzjoni tal-midjum organiku, kondizzjonijiet operazzjonali, in-natura tal-mikroorganiżmi li jkun hemm u l-influwenza tal-kimika għall-ittestjar.

41. Iddetermina s-solidi sospiżi fir-reċipjenti ta' tirwiħ għall-anqas darba fil-ġimgħa u warrab ħama żejjed biex iżżomm il-konċentrazzjoni f'1 g/l sa 3 g/l (piż fin-niexef), jew ikkontrolla kemm, bħala medja, ikollha żmien il-ħama, f'valur kostanti, is-soltu fil-firxa ta' 6 ijiem sa 10 ijiem. Jekk, pereżempju, jingħażel żmien ta' retenzjoni ta' ħama ta' 8 ijiem, neħħi kuljum 1/8 tal-volum tal-ħama attivat fir-reċipjent ta' tirwiħ u warrbu. Agħmel dan kuljum jew, aħjar, permezz ta' pompa taħdem awtomatikament minn ħin għal ieħor. Iż-żamma tal-konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi b'mod kostanti, jew f'limiti stretti, ma żżommx żmien kostanti ta' retenzjoni ta' ħama (SRT), li huwa l-varjabbli operazzjonali li jiddetermina l-valur tal-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fl-effluwent.

42. Matul it-test kollu, neħħi, mill-anqas kuljum, kull ħama li jeħel mal-ħitan tar-reċipjent ta' tirwiħ u mas-separatur biex jerġa' jkun sospiż. Ikkontrolla u naddaf regolarment it-tubi kollha u s-sistema tat-tubi biex ma tħallix tikber bijorita. Irriċikla l-ħama li jkun qagħad mis-separatur għal ġor-reċipjent ta' tirwiħ, preferibbilment b'ippumpjar kull tant ħin. Ebda riċiklar ma jsir fis-sistema ta' borma poruża iżda żgura li borom ta' ġewwa jiddaħħlu nodfa qabel ma l-volum fir-reċipjent jogħla b'mod sinifikanti (paragrafu 21).

43. Jista' jkun hemm ħama li ma joqgħodx tajjeb u telf ta' ħama fl-unitajiet ta' impjanti Husmann. Dan jista' jissewwa billi ssir azzjoni waħda jew aktar, elenkati hawn taħt, fl-istess waqt tat-test u tal-unitajiet ta' kontroll:

— ħama friska jew flocculi (pereżempju 2 ml/reċipjent ta' 50 g/l $FeCl_3$) jistgħu jiżdiedu f'intervalli regolari, eż. kull ġimgħa, iżda aċċerta li ma jseħħu ebda reazzjoni jew preċipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ma' $FeCl_3$;

▼M4

— il-pompa ta’ estrazzjoni bl-arja tista’ tiġi sostitwita b’pompa peristaltika, biex b’hekk ikun jista’ jkun hemm fluss ta’ ċirkulazzjoni mill-ġdid ta’ ħama li jkun kważi daqs il-fluss tal-influwent li jkollu jintuża u li jippermetti żvilupp ta’ żona anaerobika fil-ħama qiegħed (il-ġeometrija tal-pompa ta’ estrazzjoni bl-arja tillimita r-rata minima ta’ fluss ta’ ħama li jkun mar lura għal madwar 12-il darba ta’ dik tal-influwent);

— ħama jista’ jiġi ppumpjat minn ħin għal ieħor mis-separatur għal ġor-reċipjent ta’ tirwiħ (eż. kull 5 min. kull 2,5 h biex ikun irriċiklat 1 l/h to 1,5 l/h;

— jista’ jintuża aġent mhux tossiku, kontra r-ragħwa f’konċentrazzjoni minima biex ma jitħalliex ikun hemm telf minħabba r-ragħwa (eż. żejt tas-silikon);

— l-arja tista’ tiġi mgħoddija mill-ħama fis-separatur bi skossi qosra, mfaqqa’ (eż. 10 sek. kull siegħa);

— il-midjum organiku jista’ jiġi ddoċat f’intervalli fir-reċipjent ta’ tirwiħ (eż. 3 minuti sa 10 minuti kull siegħa).

Teħid ta’ kampjuni u analiżi

44. F’intervalli regolari kejjel il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul, it-temperatura u l-valur pH tal-ħama attivat fir-reċipjenti ta’ tirwiħ. Żgura li dejjem ikun hemm ossiġnu biżżejjed (> 2 mg/l) u li t-temperatura tinżamm fil-firxa meħtieġa (normalment 20 °C sa 25 °C). Żomm il-pH f’7,5 ± 0,5 billi tiddoża ammonti żgħar ta’ bażi inorganiku jew aċidu fir-reċipjent ta’ tirwiħ jew fl-influwent, jew billi żżid il-kapaċità ta’ lqugħ tal-midjum organiku (ara l-paragrafu 27). Meta jkun hemm nitrifikazzjoni jkun prodott l-aċidu, bl-ossidazzjoni ta’ 1 mg N tipproduċi l-ekwivalenti ta’ madwar 7 mg CO_3. Kemm il-kejlijiet ikun ta’ spiss jiddependi mill-parametru li jkollu jitkejjel u mill-istabbiltà tas-sistema, u jista’ jvarja bejn kejl kuljum u kejl kull ġimgħa.

45. Kejjel DOC jew COD fl-influwenti għar-reċipjenti ta’ kontroll u ttestjar. Kejjel il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-influwent tat-test b’analiżi speċifika jew stmaha mill-konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ta’ stokkijiet (paragrafu 31), mill-volum użat u mill-ammont ta’ dranaġġ iddożat għal ġol-unità ta’ ttestjar. Huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar tkun ikkalkulata biex titnaqqas il-varjabbiltà tad-dejta tal-konċentrazzjoni.

46. Ħu kampjuni adatti mill-effluwent miġbur (eż. komposti ta’ 24 h) u ffiltra minn ġo membrana b’pori ta’ daqs ta’ 0,45 μm jew agħmel ċentrifugu minnhom f’madwar 40,000 m/s^2 għal madwar 15-il min. Centrifugu għandu jsir jekk il-filtrazzjoni tkun diffiċli. Iddetermina DOC jew COD mill-anqas b’mod duplikat biex tkejjel il-bijodegradazzjoni finali u, jekk tkun meħtieġa, il-bijodegradazzjoni primarja b’analiżi b’mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar.

47. L-użu ta’ COD jista’ jġib miegħu problemi analitiċi f’konċentrazzjonijiet baxxi u, għalhekk, huwa rrakkomandat biss jekk tintuża konċentrazzjoni tat-test li tkun għolja biżżejjed (madwar 30 mg/l). Barra dan, għall-kimiċi li jassorbu ħafna, huwa rrakkomandat li l-ammont ta’ kimika assorbita fil-ħama titkejjel billi tintuża teknika analitika b’mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar.

48. Il-frekwenza ta’ teħid ta’ kampjuni tiddependi minn kemm ikun mistenni jdum it-test. Frekwenza rakkomandata tkun ta’ tliet darbiet fil-ġimgħa. Malli l-unitajiet ikunu qed jaħdmu b’mod effiċjenti, ħalli minn ġimgħa sa mhux aktar minn 6 ġimgħat wara li l-kimika għall-ittestjar tkun iddaħħlet, biex din tadatta u tilħaq stat regolari. Preferibbilment ikseb mill-anqas 15-il valur validu fil-fażi ta’ livell kostanti (paragrafu 59), li normalment iddum 3 ġimgħat, għall-evalwazzjoni tar-riżultat tat-test. It-test jista’ jitlesta jekk jintlaħaq grad suffiċjenti ta’ eliminazzjoni (eż. > 90 %) u jkunu disponibbli dawn il-15-il valur, li jirrappreżentaw analiżi magħmula kull jum tal-ġimgħa tul 3 ġimgħat. Normalment taqbiżx durata ta’ test ta’ aktar minn 12-il ġimgħa wara li tkun żdiedet il-kimika għall-ittestjar.

▼M4

49. Jekk il-ħama jinbidel f'nitrat jew f'nitritu u jekk l-effetti tal-kimika għall-ittestjar fuq in-nitrifikazzjoni jkollhom ikunu studjati, analizza kampjuni mill-effluwent tat-unitajiet ta' ttestjar u ta' kontroll mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ammonju u/jew nitrit flimkien ma' nitrat.

50. L-analiżi kollha għandha ssir malajr kemm jista' jkun, l-aktar id-determinazzjonijiet tan-nitroġenu. Jekk analiżi jkollha tiġi posposta, aħżen il-kampjuni f'madwar 4 °C fid-dlam fi fliexken mimlijin u magħluqin issikkati. Jekk kampjuni jkollhom jinħażnu għal aktar minn 48 siegħa, ippreservahom fil-friża, b'aċidifikazzjoni (eż. 10 ml/l ta' soluzzjoni ta' 400 g/l ta' aċidu sulfuriku) jew biż-żieda ta' kimika tossika adatta (eż. 20 ml/l ta' soluzzjoni ta' 10 g/l ta' klorur tal-merkurju (II)). Żgura li t-teknika ta' preservazzjoni ma tinfluwenzax riżultati ta' analiżi.

Akkoppjar ta' unitajiet ta' ttestjar

51. Jekk ikollu jintuża akkoppjar (Appendiċi 3), ibdel kuljum l-istess ammont ta' ħama attivat (150 ml sa 1 500 ml għal reċipjenti ta' tirwiħ li jkun fihom 3 litri ta' likwidu) bejn ir-reċipjenti ta' tirwiħ tal-unità ta' ttestjar u l-unità ta' kontroll tagħha. Jekk il-kimika għall-ittestjar tassorbixxi ħafna mill-ħama, ibdel biss is-supernatant tas-separaturi. Fiż-żewġ każijiet uża fattur ta' korrezzjoni biex tikkalkula r-riżultat tat-test (paragrafu 55).

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

52. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD tal-kimika għall-ittestjar għal kull valutazzjoni li jkun itteħdilha l-ħin, billi tuża l-ekwazzjoni:

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

fejn

D_t = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD f'ħin t

C_s = DOC jew COD fl-influwent minħabba l-kimika għall-ittestjar, preferibbilment stmat mis-soluzzjoni ta' stokkijiet (mg/l)

E = valur imkejjel ta' DOC jew COD fl-effluwent tat-test f'ħin t (mg/l)

E_o = valur imkejjel ta' DOC jew COD fl-effluwent tal-kontroll f'ħin t (mg/l)

53. Il-grad ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll ikun ta' informazzjoni utli biex tkun ivvalutata l-attività bijodegradattiva tal-ħama attivat matul it-test. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni bl-ekwazzjoni:

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

fejn

D_B = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll f'ħin t

C_M = DOC jew COD tal-midjum organiku fl-influwent tal-kontroll (mg/l)

▼M4

B’mod fakultattiv, ikkalkula l-perċentwali ta’ eliminazzjoni DOC jew COD minħabba l-midjum organiku flimkien ma’ kimika għall-ittestjar fl-unità ta’ ttestjar bl-ekwazzjoni:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

fejn

D_T = % ta’ eliminazzjoni ta’ influwent totali tat-test DOC jew COD

C_T = DOC jew COD ta’ influwent totali tat-test jew ikkalkulat mis-soluzzjonijiet ta’ stokkijiet (mg/l)

54. Ikkalkula t-tneħħija tal-kimika għall-ittestjar jekk din titkejjel b’metodu analitiku speċifiku f’valutazzjoni ta’ kull darba bl-ekwazzjoni:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

fejn

D_{ST} = % ta’ eliminazzjoni primarja ta’ kimika għall-ittestjar f’ħin t

S_i = konċentrazzjoni mkejla jew stmata tal-kimika għall-ittestjar fl-influwent tat-test (mg/l)

S_e = konċentrazzjoni mkejla tal-kimika għall-ittestjar f’effluwent ta’ test f’ħin t (mg/l)

55. Jekk tkun ntużat il-modalità ta’ akkoppjar, ikkumpensa d-dilwizzjoni tal-kimika għall-ittestjar fir-reċipjent ta’ tirwiħ bl-iskambju ta’ ħama billi tuża fattur ta’ korrezzjoni (ara l-Appendiċi 3). Jekk ikunu ġew użati ħin medju ta’ retenzjoni idrawlika ta’ 6 sigħat u skambju ta’ nofs il-volum tal-ħama attivat fir-reċipjent ta’ tirwiħ, il-valuri determinati ta’ eliminazzjoni kuljum (D_t, paragrafu 52) ikollhom ikunu kkoreġuti biex jinkiseb il-grad veru ta’ eliminazzjoni, Dtc, tal-kimika għall-ittestjar bl-ekwazzjoni:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Espressjoni ta’ riżultati tat-testijiet

56. Immarka l-perċentwali ta’ eliminazzjoni D_t (jew D_{tc}) u D_{st}, jekk ikunu disponibbli, kontra l-ħin (ara l-Appendiċi 2). Mill-forma tal-kurva ta’ eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (per se jew bħala DOC) jistgħu jinstiltu xi konklużjonijiet dwar il-proċess ta’ tneħħija.

Sorbiment

57. Jekk tkun osservata eliminazzjoni għolja ta’ DOC tal-kimika għall-ittestjar mill-bidu tat-test, il-kimika għall-ittestjar tkun probabbilment eliminata b’sorbiment fis-solidi ta’ ħama attivat. Ikun possibbli li dan ikun ippruvat billi tkun iddeterminata l-kimika għall-ittestjar assorbita b’analiżi speċifika. Mhux is-soltu li l-eliminazzjoni ta’ DOC tal-kimiċi li jistgħu jkunu assorbiti tibqa’ għolja matul it-test kollu; normalment ikun hemm grad għoli ta’ tneħħija fil-bidu li bil-mod il-mod jinżel għal valur ta’ ekwilibriju. Jekk, iżda, il-kimika għall-ittestjar li tista’ tkun assorbita, setgħet ikkawżat akklimatazzjoni tal-massa mikrobika b’xi mod jew ieħor, l-eliminazzjoni ta’ DOC tal-kimika għall-ittestjar wara tiżdied u tilħaq valur livell kostanti għoli.

▼M4

Fażi ta' intervalli

58. Bħal f'testijiet statiċi, ta' tgħarbil, ħafna kimiċi għall-ittestjar jeħtieġu fażi ta' intervalli qabel ma sseħħ bijodegradazzjoni sħiħa. Fil-fażi ta' intervalli, isseħħ akklimatazzjoni jew adattament tal-batterja li tkun qed tiddegrada mingħajr ma kważi titneħħa l-kimika għall-ittestjar; mbagħad iseħħ it-tkabbir tal-bidu ta' dawn il-batterji. Din il-fażi tintemm u l-fażi ta' degradazzjoni titqies li tkun bdiet meta jitneħħa madwar 10 % tal-ammont tal-bidu ta' kimika għall-ittestjar (wara li jkun tqies is-sorbiment, jekk iseħħ). Il-fażi ta' intervalli sikwit tkun varjabbli ħafna u bilkemm riproduċibbli.

Fażi ta' livell kostanti

59. Il-fażi ta' livell kostanti ta' kurva ta' eliminazzjoni f'test kontinwu hija ddefinita bħala dik il-fażi li fiha sseħħ id-degradazzjoni massima. Il-fażi ta' livell kostanti għandha tkun mill-anqas ta' 3 ġimgħat u jkollha madwar 15-il valur validu mkejjel.

Grad medju ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar

60. Ikkalkula l-valur medju mill-valuri ta' eliminazzjoni (D_t) tal-kimika għall-ittestjar fil-fażi ta' livell kostanti. Miġjub għad-dritt sal-eqreb numru sħiħ (1 %), dan ikun il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Huwa wkoll irrakkomandat li jkun ikkalkulat l-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-valur medju.

Eliminazzjoni ta' midjum organiku

61. Immarka l-perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC jew ta' COD tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll (D_B) kontra l-ħin. Indika l-grad medju ta' eliminazzjoni bl-istess mod bħal tal-kimika għall-ittestjar (paragrafu 60).

Indikazzjoni ta' bijodegradazzjoni

62. Jekk il-kimika għall-ittestjar ma tassorbix b'mod sinifikanti l-ħama attivat, u l-kurva ta' eliminazzjoni jkollha forma tipika ta' kurva ta' bijodegradazzjoni b'intervall, fażijiet ta' degradazzjoni u livell kostanti (paragrafi 58, 59), l-eliminazzjoni mkejla tista' kważi fiċ-ċert tkun attribwita lill-bijodegradazzjoni. Jekk tkun seħħet tneħħija inizjali għolja, it-test ta' simulazzjoni ma jkunx jista' jiddivrenzja bejn proċessi ta' eliminazzjoni bijoloġiċi u abijotiċi. F'każijiet bħal dawn, u f'każijiet oħra meta jkun hemm xi dubju dwar il-bijodegradazzjoni (eż. jekk isir stripaġġ), analizza l-kimiċi għall-ittestjar assorbiti jew agħmel testijiet statiċi addizzjonali ta' bijodegradazzjoni ibbażati fuq parametri li jindikaw b'mod ċar proċessi bijoloġiċi. Testijiet bħal dawn huma l-metodi ta' konsum ta' ossiġnu (il-Kapitolu C.4 D, E u F ta' dan l-Anness (6)) jew test b'kejl ta' produzzjoni ta' diossidu tal-karbonju (il-Kapitolu C.4 C ta' dan l-Anness (6)) jew il-metodu ta' Spazju Fuq ta' ISO (18), billi tintuża tilqima esposta minn qabel mit-test ta' simulazzjoni. Jekk kemm it-tneħħija ta' DOC, kif ukoll it-tneħħija ta' kimika speċifika jkunu tkejlu, differenzi sinifikanti (tal-ewwel ikunu anqas minn tal-aħħar) bejn il-perċentwali mneħħija jindikaw li kien hemm fl-effluwenti prodotti organiċi intermedji li jistgħu jkunu aktar diffiċli li jiddegradaw milli l-kimika prinċipali.

Validità ta' riżultati tat-testijiet

63. Informazzjoni dwar imġiba normali ta' bijodegradazzjoni tat-tilqima tinkiseb jekk ikun iddeterminat il-grad ta' eliminazzjoni tal-midjum organiku (paragrafu 53) fl-unità ta' kontroll. Qis it-test bħala validu jekk il-grad ta' eliminazzjoni ta' DOC jew ta' COD fl-unità/unitajiet ta' kontroll ikun > 80 % wara ġimagħtejn u ma tkun saret ebda osservazzjoni mhux tas-soltu.

▼M4

64. Jekk tkun intużat kimika (ta' referenza) bijodegradabbli faċilment, il-grad ta' bijodegradazzjoni (D_t, paragrafu 52) għandu jkun > 90 %.

65. Jekk it-test isir f'kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni, il-konċentrazzjoni medja fl-effluwenti għandha tkun < 1 mg/l ammonja-N u < 2 mg/l nitrit-N.

66. Jekk dawn il-kriterji (paragrafi 63-65) ma jitħarsux, tenni t-test billi tuża tilqima minn sors differenti, ittestja kimika ta' referenza, u eżamina mill-ġdid il-proċeduri kollha sperimentali.

Rapport tat-test

67. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Kimika għall-ittestjar:

— dejta ta' identifikazzjoni;

— natura fiżika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi.

Kondizzjonijiet tat-test:

— tip ta' sistema ta' ttestjar; kull modifika għall-ittestjar tal-kimiċi li ma jinħallux u jkunu volatili;

— tip ta' midjum organiku;

— proporzjon u natura ta' ilmijiet industrijali mormija fid-dranaġġ, jekk ikunu magħrufa;

— tilqima, natura u sit(i) ta' teħid ta' kampjuni, konċentrazzjoni u kull trattament minn qabel;

— soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimiċi għall-ittestjar: kontenut ta' DOC u ta' TOC; kif titħejja, jekk ta' sospensjoni; konċentrazzjoni tat-test użata; raġunijiet jekk ikunu 'l barra mill-firxa ta' 10 - 20 mg/l DOC; metodu ta' żieda; data tal-ewwel żieda; kull bidla;

— kemm, bħala medja, ikollha żmien il-ħama u ħin medju ta' retenzjoni idrawlika; metodu ta' rimi ta' ħama; metodi li jegħlbu l-kwantitajiet, telf ta' ħama, eċċ.;

— tekniċi analitiċi użati;

— temperatura tat-test;

— kwalitajiet tal-kwantitajiet ta' ħama, indiċi ta' volumi ta' ħama (SVI), solidi sospiżi ta' likwidu mħallat (MLSS);

— kull devjazzjoni minn proċeduri standard u kull ċirkostanza li setgħet affettwat riżultati.

Riżultati tat-testijiet:

— dejta mkejla kollha (DOC, COD, analiżi speċifika, pH, temperatura, konċentrazzjoni tal-ossiġnu, solidi sospiżi, l-kimiċi N, jekk rilevanti;

— il-valuri kollha kkalkolati ta' D_t (jew D_{tc}), D_B, D_{St} miksuba f'forma tabulari u l-kurvi ta' eliminazzjoni;

— informazzjoni dwar fażijiet ta' intervalli u ta' livelli kostanti, durata ta' testijiet, il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar u dak tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll, flimkien ma' informazzjoni dwar statistika u dikjarazzjonijiet dwar il-bijodegradabbiltà u l-validità tat-test;

— diskussjoni dwar ir-riżultati.

▼**M4**

LETTERATURA:

(1) Swisher RD (1987). “Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Chapter C.4 of this Annex, Determination of ‘Ready’ Biodegradability.

(7) Chapter C.12 of this Annex, Biodegradation - Modified SCAS Test.

(8) Chapter C.19 of this Annex, Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{OC}) on Soil and on Sewage Sludge Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK u Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

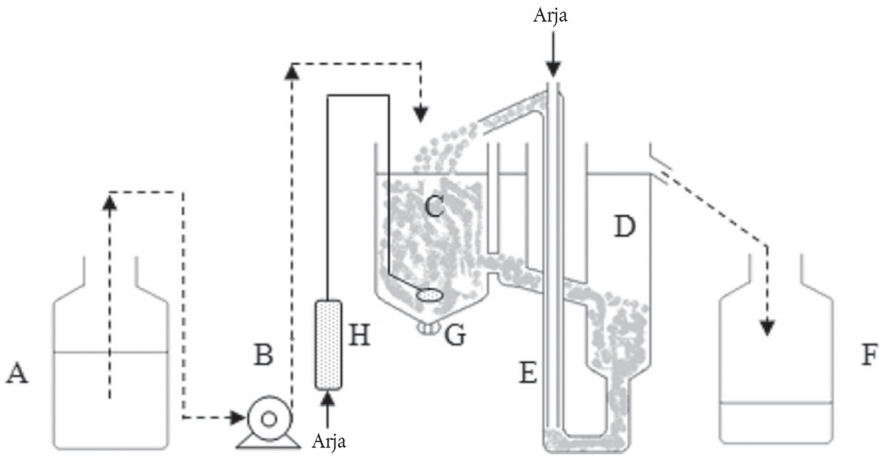
▼M4

Appendiċi 1

Figura 1

Tagħmir użat għall-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà

Unità Husmann



A. Reċipjent ta' ħżin

B. Pompa tad-dożar

C. Kompartiment ta' tirwiħ (3 l kapaċità)

D. Reċipjent ta' sediment

E. Pompa ta' estrazzjoni bl-arja

F. Reċipjent ta' ġbir

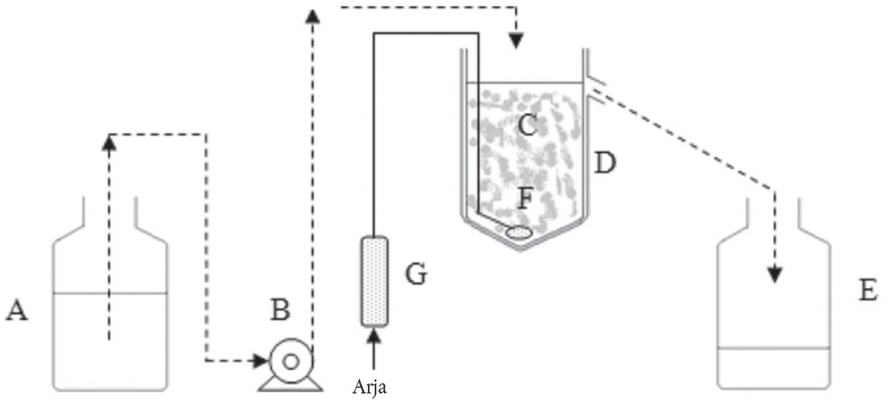
G. Rewwieħ

H. Miter ta' fluss ta' arja

Figura 2

Tagħmir użat għall-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà

Borma poruża



A. Reċipjent ta' ħżin

B. Pompa tad-dożar

C. Borma poruża ta' tirwiħ

D. Reċipjent ta' barra impermeabbli

E. Reċipjent ta' ġbir

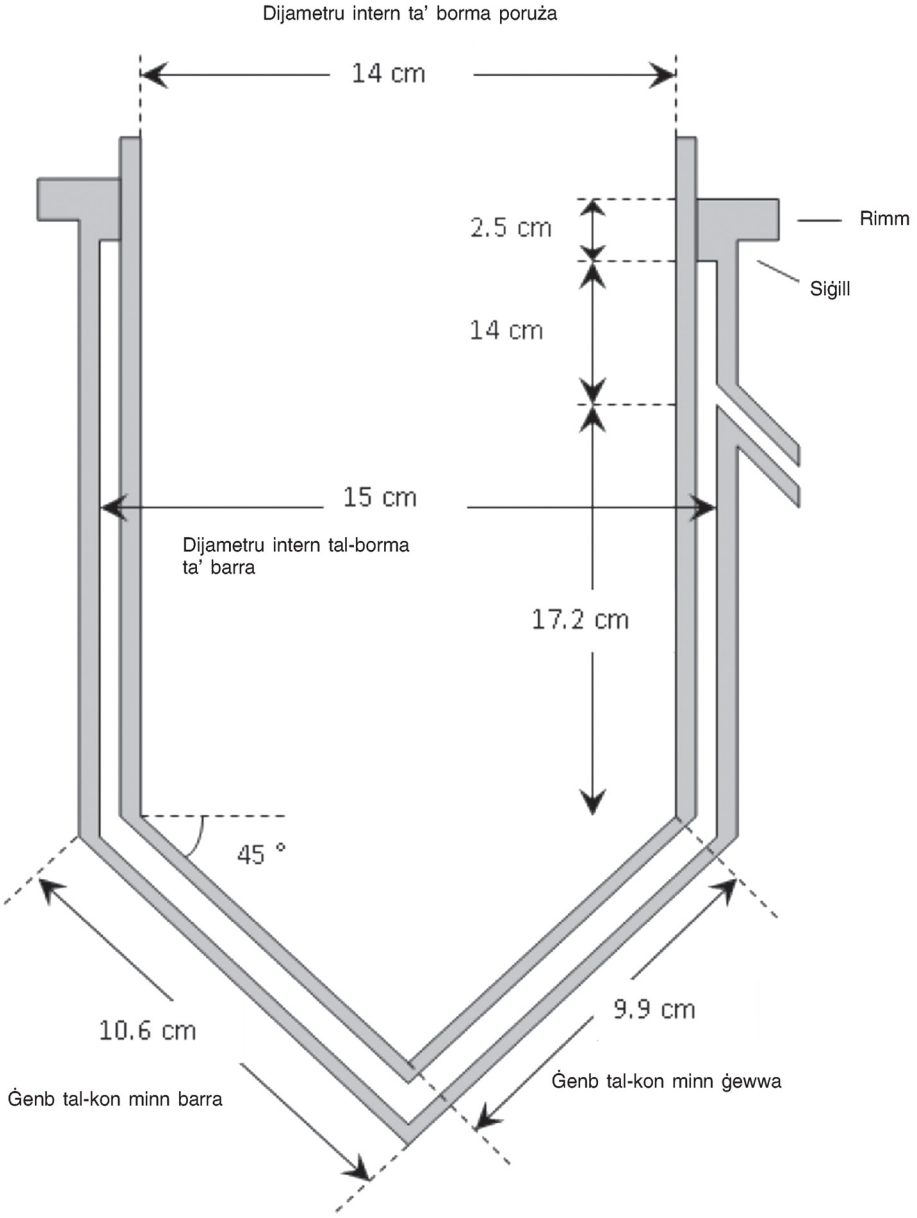
F. Diffużur

G. Miter ta' fluss ta' arja

▼**M4**

Figura 3

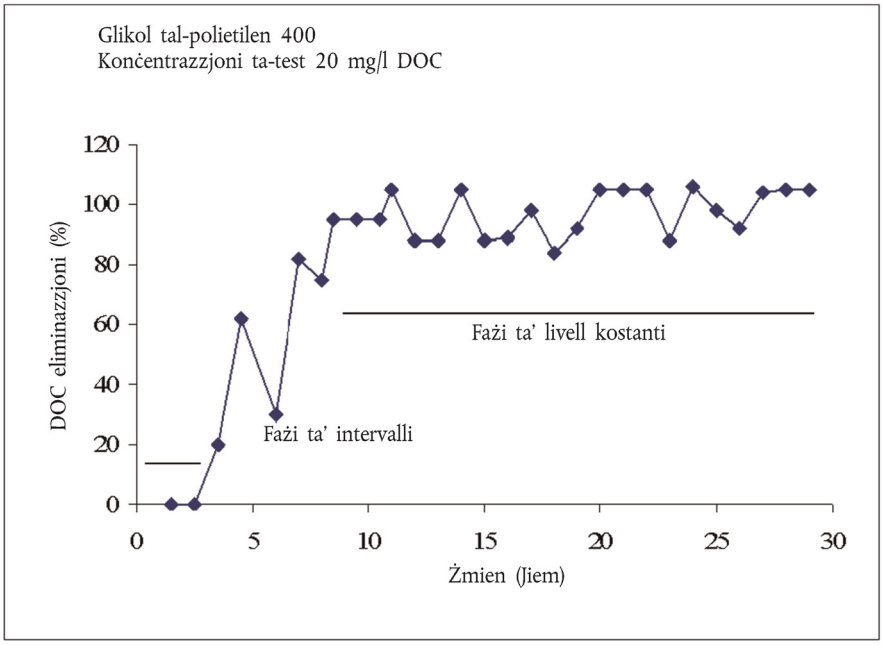
Dettalji ta' reċipjent ta' tirwiħ ta' borma poruża ta' 3 litri



▼**M4**

Appendiċi 2

Eżempju ta' kurva ta' eliminazzjoni



▼**M4**

Appendiċi 3

[INFORMATTIV]

AKKOPPJAR TAL-UNITAJIET TA' TTESTJAR

Għall-tentattiv biex il-mases mikrobiċi jkunu ndaqs f'ħama f'unità ta' ttestjar, li tirċievi dranaġġ flimkien ma' kimika għall-ittestjar, u f'unità ta' kontroll, li tirċievi dranaġġ biss, kien introdott skambju ta' ħama kuljum (1). Il-proċedura ssejħet akkoppjar u l-metodu huwa magħruf bħala unitajiet akkoppjati. L-akkoppjar għall-bidu kien isir billi kienu jintużaw unitajiet Husmann ta' ħama attivat, iżda kien isir ukoll b'unitajiet ta' Borma Poruża (2)(3). Ma kienu nstabu ebda differenzi sinifikanti f'riżultati ta' bejn unitajiet mhux akkoppjati u akkoppjati, kemm jekk ta' Husmann jew ta' Borma Poruża, għalhekk m'hemm ebda vantaġġ f'ħela' ta' żmien u enerġija meħtieġa biex unitajiet ikunu akkoppjati.

Skambju ta' ħama jista' jagħti dehra ta' tneħħija tassew konsiderevoli, minħabba li xi ftit mil-kimika għall-ittestjar tiġi ttrasferita u l-konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar fl-effluwenti ta' test u kontroll isiru aktar kważi ndaqs. Għalhekk ikollhom jintużaw fatturi korrettivi, li jkunu jiddependu mill-frazzjoni skambjata u mill-ħin medju ta' retenzjoni idrawlika. Kienu ppubblikati aktar dettalji tal-kalkulazzjoni (1).

Ikkalkula l-grad ta' eliminazzjoni kkoreġuta ta' DOC jew COD billi tuża l-formula ġenerali:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

fejn

D_{tc} = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD ikkoreġut

D_t = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD determinat

a = frazzjoni ta' skambju tal-volum tal-unitajiet ta' ħama attivat

r = ħin medju ta' retenzjoni idrawlika (h)

Jekk, pereżempju, nofs il-volum tat-tank ta' tirwiħ ikun skambjat (a = 0,5) u l-ħin medju ta' retenzjoni idrawlika jkun 6 h, il-formula ta' korrezzjoni tkuna:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LETTERATURA:

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Appendiċi 4

EVALWAZZJONI TA' INIBIZZJONI TAL-ĦAMA ATTIVAT

Proċess b'kimiċi għall-ittestjar

1. Kimika (jew ilma mormi) tista' ma tkunx iddegradata jew imneħħija fit-test ta' simulazzjoni u jista' wkoll ikollha effett inibitorju fuq il-mikroorganiżmi tal-ħama. Kimiċi oħra jkunu ddegradati bijoloġikament f'konċentrazzjonijiet baxxi iżda jkunu inibitorji f'konċentrazzjoni ogħla (ormesi). Effetti inibitorji setgħu kienu ġew żvelati fi stadju aktar bikri jew jistgħu jkunu ddeterminati bl-applikazzjoni ta' test tat-tossiċità, bl-użu ta' tilqima simili jew identika għal dik użata fit-test ta' simulazzjoni (1). Metodi bħal dawn jinibixxu konsum ta' ossiġnu (il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness (2) u ISO 8192(3)) jew inibizzjoni għal tkabbir ta' organiżmi tal-ħama (ISO 15522 (4)).

2. Fit-test ta' simulazzjoni kull inibizzjoni tkun tidher mid-differenza ta' karbonju organiku maħlul (DOC) jew mid-domanda kimika ta' ossiġnu (COD) bejn l-effluwent mir-reċipjent tat-test u dak mill-kontroll li jkun akbar minn DOC miżjud bħala kimika għall-ittestjar. Espress mod ieħor, il-perċentwali ta' tneħħija ta' DOC (u domanda biokimika ta' ossiġnu (BOD), domanda kimika ta' ossiġnu (COD), u/jew NH^{+}_{4}) tal-midjum organiku dwar trattament għandu jitnaqqas meta jkun hemm il-kimika għall-ittestjar. Jekk dan iseħħ, it-test għandu jittenna billi titnaqqas il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar sakemm jintlaħaq livell li fih ma sseħħ ebda inibizzjoni u forsi titnaqqas aktar il-konċentrazzjoni sakemm il-kimika għall-ittestjar tkun iddegradata bijoloġikament. Iżda jekk il-kimika għall-ittestjar (jew ilma mormi) ikollhom effetti ħżiena fuq il-proċess fil-konċentrazzjonijiet kollha ttestjati, l-indikazzjonijiet ikunu li l-kimika tkun diffiċli, jekk mhux impossibbli, li tkun ttrattata bijoloġikment, iżda jista' jkun siewi li t-test jittenna b'ħama attivat minn sors differenti u/jew il-ħama jkun soġġett għal akklimatazzjoni gradwali.

3. Bil-maqlub, jekk il-kimika għall-ittestjar tkun eliminata bijoloġikament mal-ewwel attentat fit-test ta' simulazzjoni, il-konċentrazzjoni tagħha għandha tiżdied jekk ikun meħtieġ li jkun magħruf jekk il-kimika jkollhiex tkun inibitorja.

4. Wieħed għandu jiftakar meta jipprova jiddetermina l-gradi ta' inibizzjoni li l-massa ta' ħama attivat tista' tinbidel, biex maż-żmien il-mikroorganiżmi jkunu jistgħu jiżviluppaw tolleranza għal kimika inibitorja.

5. Kalkulazzjoni ta' grad ta' inibizzjoni:

Il-perċentwali globali ta' tneħħija ta' R_o, ta' BOD, DOC, COD, eċċ., għall-unitajiet ta' test u kontroll jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_o = 100(I - E)/I\%$$

fejn:

I = konċentrazzjoni ta' influwenti ta' BOD, DOC, COD, eċċ, għal reċipjenti ta' ittestjar u kontroll (mg/l)

E = konċentrazzjonijiet ta' effluwenti rispettivi (mg/l).

I u E għandhom ikunu kkoreġuti għal DOC minħabba l-kimika għall-ittestjar fl-unitajiet ta' test; mod ieħor il-kalkulazzjonijiet ta' perċentwali ta' inibizzjoni ma jkunux korretti.

▼**M4**

Il-grad ta' inibizzjoni kkawżat meta jkun hemm il-kimika għall-ittestjar jista' jiġi kkalkulat minn:

$$\% \text{ inibizzjoni} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

fejn:

R_c = perċentwali ta' tneħħija fir-reċipjenti ta' kontroll

R_t = perċentwali ta' tneħħija fir-reċipjenti tal-ittestjar

LETTERATURA:

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness, Bijodegradazzjoni - Test ta' Inibizzjoni ta' Respirazzjoni ta' Ħama Attivat.

(3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Appendiċi 5

Kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma - kimiċi volatili

Kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma

Ftit rapporti jidher li kienu ppubblikati dwar kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux biex jitqiegħdu għal testijiet li jissimulaw trattament ta' ilma mormi (1)(2)(3).

M'hemmx metodu wieħed ta' tixrid tal-kimika għall-ittestjar li huwa applikabbli għas-kimiċi kollha li ma jinħallux. Tnejn mill-erba' tipi ta' metodu deskritti f'ISO 10634 (4) jidhru li huma adatti biex isir attentat għal tixrid ta' kimiċi għal ittestjar ta' simulazzjoni; huma l-użu ta' aġenti emulsjonanti u/jew ta' enerġija ultrasonika. Għandha tkun iffissata l-istabbiltà tul mill-anqas perjodi ta' 24 siegħa tat-tixrid li jirriżulta. Tixridiet stabbilizzati kif jixraq, mqiegħda f'riżerva li titħawwad b'mod kostanti (paragrafu 38), ikunu mbagħad iddożati mat-tank ta' tirwiħ b'mod separat mid-dranaġġ domestiku (jew sintetiku).

Jekk it-tixrid ikun stabbli, stħarreġ kif il-kimika għall-ittestjar tista' tkun iddeterminata fil-forma mxerrda. Aktarx li DOC ma jkunx adatt, għalhekk ikollu jkun stabbilit metodu analitiku speċifiku għall-kimika għall-ittestjar li jkun jista' jiġi applikat għal effluwenti, għal solidi ta' effluwenti u għal ħama attivat. X'jiġri mil-kimika għall-ittestjar fis-simulazzjoni tal-proċess ta' ħama attivat imbagħad ikun iddeterminat f'fażijiet likwidi u solidi. B'hekk ikun stabbilit "bilanċ ta' massa" biex ikun deċiż jekk il-kimika għall-ittestjar kinitx iddegradata bijoloġikament. Iżda dan jindika biss bijodegradazzjoni primarja. Il-wiri ta' bijodegradazzjoni finali għandu jkun attentat bl-applikazzjoni ta' test respirometriku għall-bijodegradabbiltà faċli (il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness (5) C, F jew D) billi jintuża ħama ta' tilqima espost għall-kimika għall-ittestjar fit-test ta' simulazzjoni.

Kimiċi volatili

L-applikazzjoni ta' simulazzjonijiet ta' trattament ta' ilma mormi għal kimiċi volatili hija kemm dibattibbli kif ukoll problematika. Bħal f'kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma, jidher li kienu ftit ħafna r-rapporti li kienu ppubblikati li jiddeskrivu testijiet ta' simulazzjoni bl-użu ta' kimiċi volatili. Ikun adattat tip konvenzjonali ta' apparat li jħallat kollox billi jissiġilla t-tankijiet ta' tirwiħ u sediment, li jkejjel u jikkontrolla l-fluss ta' arja billi jintużaw miters ta' flussi u billi l-gass li joħroġ jgħaddi minn sifuni biex tinġabar materja organika volatili. F'xi każijiet tintuża pompa li toħloq vakwu biex tiġbed il-gass li joħroġ minn sifun "kiesaħ", jew sifun ta' tindif li jkun fih Tenax u ġell tas-silika għal analiżi kromatografika bil-gass. Il-kimika għall-ittestjar li jkun hemm fis-sifun tista' tkun iddeterminata b'mod analitiku.

It-test isir f'żewġ partijiet. L-unitajiet l-ewwel jitħaddmu mingħajr ħama iżda bl-ilma sintetiku mormi flimkien ma' kimika għall-ittestjar li tkun ippumpjata għal ġot-tank ta' tirwiħ. Jinġabru u jkunu analizzati kampjuni ta' influwent, effluwent u gass rilaxxjat għall-kimika għall-ittestjar għal ftit jiem. Mid-dejta miġbura jista' jkun ikkalkulat il-perċentwali (R_{vs}) tal-kimika għall-ittestjar imneżża' mis-sistema.

Mbagħad it-test bijoloġiku normali (bil-ħama) isir f'kondizzjonijiet operazzjonali identiċi għal dawk fl-istudju ta' stripaġġ. Jitkejlu wkoll DOC u COD biex ikun ivverifikat li l-unitajiet ikunu qed jaħdmu b'mod effiċjenti. Kull tant żmien issir analiżi biex tkun iddeterminata l-kimika għall-ittestjar fl-influwent, effluwent u gass li joħroġ fl-ewwel parti tat-test; wara akklimatazzjoni ssir analiżi aktar ta' spiss. Barra dan, mid-dejta fl-istat regolari, jistgħu jkunu kkalkulati l-perċentwali ta' tneħħija tal-kimika għall-ittestjar mill-fażi likwida bil-proċessi kollha (R_T) (fiżiċi u bijoloġiċi), kif ukoll il-proporzjon (R_V) mneżża' mis-sistema.

▼M4

Kalkulazzjoni:

(a) Fit-test mhux bijoloġiku, il-perċentwali (R_{VP}) tal-materjal tat-test imneżża' mis-sistema jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

fejn

R_{VP} = tneħħija ta' kimika għall-ittestjar bil-volatilizzazzjoni (%),

S_{VP} = kimika għall-ittestjar miġbura f'sifun expressa bħala konċentrazzjoni ekwivalenti f'faża likwida (mg/l),

S_{IP} = konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'influwent (mg/l).

(b) Fit-test bijoloġiku, il-perċentwali (R_V) tal-materjal tat-test mneżża' mis-sistema jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

fejn

R_V = tneħħija ta' kimika għall-ittestjar bil-volatilizzazzjoni f'test bijoloġiku (%),

S_V = kimika għall-ittestjar miġbura f'sifun f'test bijoloġiku, espressa bħala konċentrazzjoni ekwivalenti f'influwent likwidu (mg/l),

S_I = konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'influwent (mg/l).

(c) Fit-test bijoloġiku, il-perċentwali (R_T) tal-kimika għall-ittestjar imneħħija bil-proċessi kollha jingħata bi:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

fejn

S_E = konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fl-effluwent (likwidu) (mg/l).

(d) Għalhekk il-perċentwali (R_{BA}) mneħħija b'bijodegradazzjoni flimkien ma' sorbiment jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Għandhom isiru testijiet separati biex ikun iddeterminat iddeterminat jekk il-kimika għall-ittestjar tkunx sorbita; jekk tkun, tista' mbagħad issir korrezzjoni ulterjuri.

(e) Tqabbil bejn il-proporzjon ta' kimika għall-ittestjar imneżża' mis-sistemi tat-test bijoloġiku (R_v) u mhux bijoloġiku (R_{vp}) jindika l-effett globali li trattament bijoloġiku jkun ħalla fuq l-emissjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera.

Eżempju: Benżen

Żmien ta' ritenzjoni ta' ħama = 4 ijiem

Dranaġġ sintetiku; żmien ta' ritenzjoni = 8 sigħat

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

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

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Għalhekk,

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

R_T = 100 % u R_{BA} = 85 %.

Ma kienx suppost li l-benżen jiġi sorbit fil-ħama.

LETTERATURA:

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness: Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà "Faċli".

▼M4

Appendiċi 6

Effetti taż-żmien ta' ritenzjoni ta' ħama (SRT) fuq it-trattabbiltà ta' kimiċi

DAĦLA

1. Il-metodu deskritt fit-test prinċipali tfassal biex ikun aċċertat jekk ikimiċi ttestjati (is-soltu dawk magħrufin li huma bijodegradabbli b'mod inerenti, iżda mhux malajr) jistgħux ikunu ddegradati bijoloġikament fil-limiti imposti f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi. Ir-riżultati huma espressi skont perċentwali ta' tneħħija u perċentwali ta' bijodegradazzjoni. Il-kondizzjonijiet ta' tħaddim tal-unitajiet ta' ħama attivat u ta' għażla ta' influwent jippermettu x'aktarx varjazzjonijiet wiesgħa f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent. Testijiet isiru f'konċentrazzjoni nominali waħda biss ta' solidi ta' ħama jew f'ħin nominali wieħed ta' retenzjoni ta' ħama (SRT) u reġimi ta' rimi ta' ħama deskritti jistgħu jikkawżaw li l-valur ta' SRT ivarja mhux ħażin matul it-test, kemm minn jum għal ieħor kif ukoll matul jum.

2. F'dan il-varjant (1)(2) l-SRT huwa kkontrollat f'limiti ħafna aktar dojoq matul kull perjodu ta' 24 siegħa (kif sewwasew jiġri fuq l-iskala l-kbira) li jirriżulta f'konċentrazzjoni aktar kostanti fl-effluwenti. Huwa rrakkomandat dranaġġ domestiku minħabba li jagħti perċentwali ta' tneħħija aktar konsistenti u ogħla. L-effetti wkoll ta' għadd ta' valuri ta' SRT ikunu mistħarġa u fi studju aktar dettaljat ikunu jistgħu jiġu ddeterminati l-effetti ta' firxa ta' temperaturi fuq konċentrazzjoni ta' effluwenti.

3. M'hemmx qbil ġenerali s'issa dwar liema mudelli kinetiċi joperaw meta kimiċi jiddegradaw bijoloġikament taħt kondizzjonijiet fi trattament ta' ilma mormi. Ġew magħżula l-mudell Monod tat-tkabbir tal-batterji u l-użu tas-substrat (1)(2) biex jiġu applikati għad-dejta miġbura, għaliex il-metodu kien intenzjonat li jiġi applikat biss għall-kimiċi prodotti f'tunnellati kbar, li jirriżultaw f'konċentraazzjoni ta' dranaġġ ta' iktar minn 1 mg/l. Il-validità tal-mudell simplifikat u l-assunzjonaijiet li saru ġew stabbiliti permezz tal-użu ta' serje ta' ossilati tal-alkoħol li jkollhom gradi varji ta' bijodegradabbilità primarja (2)(3).

Nota. Dan il-metodu ta' varjant isegwi mill-qrib ħafna t-test ta' dan il-metodu C.10-A ta' ttestjar u dawk id-dettalji li huma biss differenti jingħataw hawnhekk aktar 'l isfel.

PRINĊIPJU TAT-TEST

4. Unitajiet ta' borom poruż ta' ħama attivat, mfasslin biex jiffaċilitaw ir-rimi (kważi) kontinwu ta' likwidu mħallat li jippermettu kontroll preċiż ħafna tal-żmien ta' retenzjoni ta' ħama (SRT, jew θ_s), jitħaddmu fil-modalità mhux akkoppjata tul firxa ta' SRTs u, fakultattivament, tul firxa ta' temperaturi. Il-ħin ta' ritenzjoni huwa normalment 2 sa 10 ijiem u t-temperatura bejn 5 u 20 °C. Dranaġġ, preferibbilment domestiku, u soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar jitħalltu b'mod separat mal-unitajiet f'rati li jagħtu ż-żmien meħtieġ ta' retenzjoni ta' dranaġġ (3 sa 6 sigħat) u l-konċentrazzjoni meħtieġa ta' kimika għall-ittestjar fl-influwent. Unitajiet ta' kontroll li ma jirċievi ebda kimika għall-ittestjar jitħaddmu b'mod parallel għal finijiet komparattivi.

5. Tipi oħra ta' apparat jistgħu jintużaw iżda għandha tkun eżerċitata attenzjoni kbira biex ikun żgurat li jintlaħaq kontroll tajjeb ta' SRT. Pereżempju, meta jintużaw impjanti, li jinkorporaw apparat ta' sediment, jista' jkun meħtieġ li jsir tnaqqis għal telf ta' solidi mill-effluwenti tal-impjant. Barra dan, għandhom jittieħdu wkoll prekawzjonijiet speċjali biex ikunu evitati żbalji minħabba varjazzjoni fil-kwantità ta' ħama fl-apparat ta' sediment.

▼M4

6. L-unitajiet jitħaddmu skont is-sett ta' kondizzjonijiet magħżul għal kull waħda minnhom u, wara li jintlaħaq ekwilibriju, il-konċentrazzjonijiet medji ta' stat regolari fl-effluwenti ta' kimika għall-ittestjar u, fakultattivament f'DOC, jinkisbu tul perjodu ta' madwar tliet ġimgħat. Minbarra li jkun ivvalutat il-perċentwali ta' tneħħija ta' kimika għall-ittestjar u, fakultattivament DOC, ir-relazzjoni bejn kondizzjonijiet ta' tħaddim ta' impjant u l-konċentrazzjoni fl-effluwent tkun espressa f'forma grafika. Minn dan ikunu jistgħu jiġu kkalkulati l-kostanti kinetiċi tentattivi u jkunu jistgħu jiġu previsti l-kondizzjonijiet li fihom il-kimika għall-ittestjar tkun tista' tiġi ttrattata.

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR

7. Japplikaw il-paragrafi 12 u 13 tal-Kapitolu C.10 A.

LIVELLI TA' PASS

8. Japplikaw il-paragrafi 14 u 15 tal-Kapitolu C.10 A.

KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR TA' REFERENZA

9. Japplika l-paragrafi 16 tal-Kapitolu C.10 A.

RIŻULTATI RIPRODUĊIBBLI TA' TESTIJIET

10. Japplikaw il-paragrafi 17 u 18 tal-Kapitolu C.10 A.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

11. Unità adatta hija s-sistema modifikata ta' borom poruži (Appendiċi 6.1). Tikkonsisti f'reċipjent intern (jew inforra) magħmula minn polipropilin poruż ta' 3.2 mm ħxuna u pori daqs bejn wieħed u ieħor 90 μm, bil-minċott issaldjat mal-maqbad. (Dan jagħmel unità aktar robusta minn dik deskritta fil-paragrafu 21 ta' dan il-kapitolu, C.10 A). L-inforra titqiegħed f'reċipjent estern tal-polietilen li minnu ma jgħaddix ilma, li jkun magħmul minn żewġ partijiet: bażi tonda li fiha jittaqqbu toqob biex fihom jitpoġġew żewġ linji tal-arja u linja għar-rimi tal-ħama, u ċilindru fin-naħa ta' fuq imwaħħal bil-viti fil-bażi u li jkollu fetħa mqiegħda b'mod li tagħti volum magħruf (3 l) fir-reċipjent tal-borma poruża. Waħda mil-linji tal-arja titwaħħlilha ġebla diffuża u l-oħra tkun miftuħa fit-tarf u mqiegħda f'angolu kwadru mal-ġebla fil-borma. Din is-sistema tipproduċi t-turbulenza meħtieġa biex ikun żgurat li l-kontenut tal-borma jkun tħallat għalkollox, kif ukoll tipprovdi konċentrazzjonijiet ta' ossiġnu maħlul ta' aktar minn 2 mg/l.

12. L-għadd adatt ta' unitajiet jinżamm f'temperaturi kontrollati li jvarjaw minn 5 sa 20 °C (± 1 °C), f'banjijiet bl-ilma fi kmamar b'temperatura kostanti. Ikunu jenħtieġu żewġ pompi biex jiddożaw għal ġor-reċipjenti ta' tirwiħ is-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar u dranaġġ qiegħed fir-rati meħtieġa (0-1.0 ml/min u 0-25 ml/min, rispettivament) u t-tielet pompa biex tneħħi ħama mormi mir-reċipjenti ta' tirwiħ. Ir-rata ta' fluss ta' ħama mormi tintlaħaq billi tintuża pompa ssettjata f'rata ogħla u mħaddma minn ħin għal ieħor bl-użu ta' swiċċ tal-ħin, eż. li jaħdem għal 10 sekondi kull minuta, b'pompa b'rata ta' ħruġ ta' 3 ml/min li tirrendi rata ta' rimi ta' 0,5 ml/min.

Apparat ta' filtrazzjoni jew ċentrifugu

13. Japplika l-paragrafu 23 tal-Kapitolu C.10 A.

Apparat analitiku

14. Japplika l-paragrafu 24 tal-Kapitolu C.10 A.

Ilma

▼M4

15. Japplikaw il-paragrafi 25 u 26 tal-Kapitolu C.10 A.

Midjum organiku

16. Japplika l-paragrafu 27 tal-Kapitolu C.10 A.

Dranaġġ sintetiku

17. Japplika l-paragrafu 28 tal-Kapitolu C.10 A.

Dranaġġ domestiku

18. Japplika l-paragrafu 29 tal-Kapitolu C.10 A.

Ħama attivat

19. Japplika l-paragrafu 30 tal-Kapitolu C.10 A.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar

20. Japplikaw il-paragrafi 31 u 32 tal-Kapitolu C.10 A.

PROĊEDURA

Tħejjija tat-tilqima

21. Japplika biss il-paragrafu 34 tal-Kapitolu C.10 A – uża ħama attivat (dwar 2,5 g/l).

Għadd ta' unitajiet ta' ttestjar

22. Għal test sempliċi, jiġifieri għall-kejl ta' perċentwali ta' tneħħija, ikun jeħtieġ SRT wieħed biss, iżda biex tinkiseb dejta meħtieġa biex jitkejlu kostanti kinetiċi tentattivi jkunu jeħtieġu 4 jew 5 valuri ta' SRT. Is-soltu jintgħażlu valuri bejn 2 u 10 ijiem. Prattikament, ikun konvenjenti li jsir test f'4 jew 5 SRTs fl-istess waqt f'temperatura waħda; fi studji estiżi jintużaw l-istess valuri ta' SRT, jew forsi firxa differenti ta' valuri, f'temperaturi oħra li jvarjaw minn 5 sa 20 °C. Għal bijodegradazzjoni primarja (l-użu ewlieni), normalment tkun meħtieġa unità waħda għal kull sett ta' kondizzjonijiet. Iżda għal bijodegradabbiltà finali tkun meħtieġa unità ta' kontroll, għal kull sett ta' kondizzjonijiet, li tirċievi dranaġġ iżda mhux kimika għall-ittestjar. Jekk il-kimika għall-ittestjar titqies li tkun fid-dranaġġ użat, ikun meħtieġ li jintużaw unitajiet ta' kontroll meta tkun qed tiġi vvalutata bijodegradazzjoni primarja, u li ssir il-korrezzjoni meħtieġa fil-kalkulazzjonijiet.

Dożaġġ ta' midjum organiku u kimika għall-ittestjar

23. Japplikaw il-paragrafi 36 sa 39 tal-Kapitolu C.10 A, iżda nnota li s-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar tkun iddożata separatament u li jintużaw diversi rati ta' rimi ta' ħama. Immonitorja u aġġusta wkoll sikwit, jekk ikun meħtieġ, sa ± 10 %, ir-rata ta' fluss ta' influwenti, effluwenti u rimi ta' ħama, eż. darbtejn kuljum. Jekk jinqalgħu diffikultajiet fil-metodi analitiċi meta jintuża dranaġġ domestiku, agħmel it-test bi dranaġġ sintetiku, iżda għandu jkun żgurat li midja differenti jagħtu dejta kinetika komparabbli.

Maniġġar ta' unitajiet ta' ħama attivat

24. Japplikaw il-paragrafi 40 sa 43 tal-Kapitolu C.10 A, iżda kkontrolla l-SRT permezz tal-ħela "kostanti" tal-ħama biss.

Teħid ta' kampjuni u analiżi

25. Japplikaw il-paragrafi 44 sa 50 tal-Kapitolu C.10 A, ħlief li l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun iddeterminata u DOC ikun iddeterminat fakultattivament; m'għandux jintuża COD.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

26. Japplikaw il-paragrafi 52 sa 54 tal-Kapitolu C.10 A.

Espressjoni ta' riżultati tat-testijiet

27. Japplikaw il-paragrafi 56 sa 62 tal-Kapitolu C.10 A.

Kalkolu ta' kostanti kinetiċi

28. Huwa aktar realistiku li tkun ikkwotata l-konċentrazzjoni medja tal-istat regolari tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent u li jkun deskritt kif dan ivarja ma' kondizzjonijiet ta' tħaddim ta' impjant milli li jkun ikkwotat il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni primarja. Dan jista' jsir billi titqies l-ekwazzjoni (6) fl-Appendiċi 6.2, li tista' tirrendi valuri għal K_S, μ_m u θ_{SC}iż-żmien kritiku ta' retenzjoni ta' ħama.

(Alternattivament, valuri approssimattivi ta' K_S u μm jistgħu jinksibu permezz ta' programm sempliċi tal-kompjuter mfassal għall-kurva teoretika kkalkulata mill-ekwazzjoni 2 (Appendiċi 6.2) għall-valuri esperimentali miksuba. Għalkemm kwalunkwe soluzzjoni mogħtija mhux se tkun unika, tista' tinkiseb appromissazzjoni raġonevoli ta' K_S u μ_m.)

Varjabbiltà ta' riżultati

29. Hija esperjenza komuni li jinkisbu valuri varjabbli ta' parametri kinetiċi għal kimiċi individwali. Huwa maħsub li l-kondizzjonijiet li fihom il-ħama jkun tkabbar, kif ukoll il-kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test użat (bħal fil-paragrafu 5 u f'testijiet oħra), għandhom effett kbir fuq il-valuri li jirriżultaw. Aspett wieħed ta' din il-varjabbiltà kien diskuss minn Grady *et al* (4), li ssuġġerew li t-termini "eżistenti" u "intrinsiku" għandhom ikunu applikati għal żewġ kondizzjonijiet estremi li jirrappreżentaw il-limiti ta' stat li kultura tista' tilħaq matul esperiment kinetiku. Jekk l-istat ma jitħalliex jinbidel matul it-test, il-valuri tal-parametru kinetiku jirriflettu l-kondizzjonijiet fl-ambjent li minnu l-mikroorganiżmi jkunu ttieħdu; dawn il-valuri jissejħu "eżistenti" jew eżistenti bħalissa. Fl-estrem l-ieħor, jekk kondizzjonijiet fit-test ikunu tali li jippermettu l-iżvilupp sħiħ tas-sistema li tissintetizza l-proteina billi tippermetti rata ta' tkabbir kemm jista' jkun massima, il-parametri kinetiċi miksubin jingħad li jkunu "intrinsiċi", u jkunu dipendenti biss minn natura tas-substrat u mit-tipi ta' batterja fil-kultura. Bħala gwida, valuri eżistenti jinkisbu billi l-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' substrat għal mikroorganiżmi kompetenti (S_o/X_o) jinżamm baxx, eż. 0.025, u jkun hemm valuri intrinsiċi meta l-proporzjon ikun għoli eż. mill-anqas 20. Fiż-żewġ każijiet, S_o għandu jkun ugwali għal jew jaqbeż il-valur rilevanti ta' Ks, il-kostant ta' nofs saturazzjoni.

30. Il-varjabbiltà u aspetti oħra ta' bijodegradazzjoni kinetika kienu diskussi f'workshop riċenti ta' SETAC (5). Minn studji bħal dawn, rapportati u proġettati, għandha toħroġ ma ddumx stampa aktar ċara ta' kinetika li topera f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi biex tgħin ikun hemm interpretazzjoni aħjar ta' dejta eżistenti, kif ukoll biex tissuġġerixxi disinji aktar rilevanti għal Metodi ta' Ttestjar fil-ġejjieni.

LETTERATURA:

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

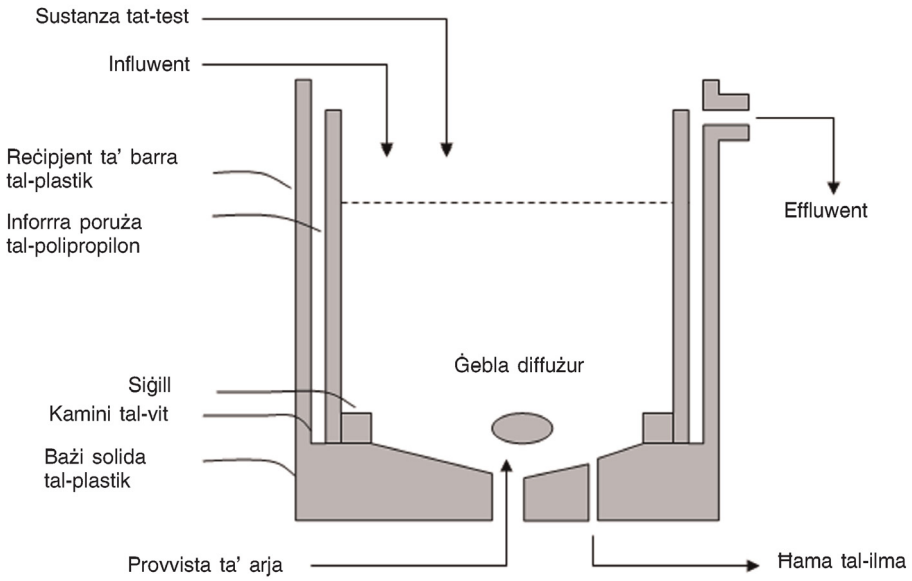
(4) Grady CPL, Smets BF u Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Ewropa, Brussell.

▼**M4**

Appendiċi 6.1

Borma Poruża b'Kontroll SRT



▼M4

Appendiċi 6.2

Kalkolu ta' Kostanti kinetiċi

1. Jekk wieħed jassumi li l-kinetika Monod tapplika u meta jitqies bilanċ ta' massa ta' solidi u substrat attivi fis-sistema kollha ta' ħama attivat (1), jistgħu jinkisbu dawn l-espressjonijiet ta' stat regolari li ġejjin:

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

jew

$$S_l = \frac{K_s \cdot (1 + \mathrm{K_d} \cdot \theta_\mathrm{s})}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

Fejn:

S_1 = konċentrazzjoni ta' substrat fl-effluwent, (mg/l)

K_S = kostant ta' nofs saturazzjoni, il-konċentrazzjoni li fiha $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = = rata speċifika ta' tkabbir (d^{-1})

μ_m = valur massimu ta' μ_m (d^{-1})

K_d = rata speċifika ta' diżintegrazzjoni ta' solidi attivi (d^{-1})

θ_S = żmien medju ta' retenzjoni ta' ħama, SRT (d)

Eżami ta' din l-ekwazzjoni jwassal għall-konklużjonijiet li ġejjin:

(i) Il-konċentrazzjoni tal-effluwenti hija indipendenti minn dik fl-influwent (S_0); għalhekk, il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni tvarja mal-konċentrazzjoni tal-influwenti, S_0.

(ii) L-uniku parametru ta' kontroll ta' impjanti li jaffettwa S_1 huwa ż-żmien ta' retenzjoni ta' ħama, θ_S.

(iii) Għal konċentrazzjoni partikolari fl-influwent, S_0, ikun hemm żmien kritiku ta' retenzjoni ta' ħama, b'mod li:

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

Fejn:

θ_{SC} = żmien kritiku ta' retenzjoni ta' ħama, li taħtu l-mikroorganiżmi kompetenti jintefgħu 'l barra mal-ħasil tal-impjant.

(iv) Minħabba li l-parametri l-oħra fl-ekwazzjoni (2) huma assoċjati ma' kinetika ta' tkabbir, it-temperatura aktarx taffettwa l-livell tas-substrat tal-effluwent u ż-żmien kritiku li jkollu l-ħama, jiġifieri ż-żmien ta' ritenzjoni ta' ħama meħtieġ biex jinkiseb ċertu grad ta' trattament jiżdied mat-tnaqqis fit-temperatura.

2. Minn bilanċ ta' massa ta' solidi fis-sistema ta' borma poruża, u jekk wieħed jassumi li l-konċentrazzjoni ta' solidi fl-effluwent tal-impjant, X_2, tkun baxxa mqabbla ma' dik fir-reċipjent ta' tirwiħ, X_1, il-żmien ta' ritenzjoni ta' ħama

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

▼M4

u

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

fejn

V = volum tar-reċipjent ta' tirwiħ (l)

X_1 = konċentrazzjoni ta' solidi fir-reċipjent ta' tirwiħ (mg/l)

X_2 = konċentrazzjoni ta' solidi fl-effluwent (mg/l)

Q_0 = rata ta' fluss tal-influwent (l/d)

Q_1 = rata ta' fluss ta' ħama mormi (l/d)

Għalhekk ikun possibbli li jkun ikkontrollat iż-żmien ta' ritenzjoni ta' ħama f'kull valur magħżul minn qabel bil-kontroll tar-rata ta' fluss ta' ħama mormi, Q_1.

Konklużjonijiet:

3. L-għan ewlieni tat-test huwa, għalhekk, li jħalli jkun hemm il-konċentrazzjoni tal-effluwenti, u b'hekk ikunu previsti l-livelli ta' kimika għall-ittestjar fl-ilmijiet li jirċevuhom.

4. Bl-immarkar ta' S_1, vs. θ_S, il-ħin kritiku ta' retenzjoni ta' ħama, θ_{SC}, jista' minn xi daqqiet ikun evalwat malajr, eż. il-kurva 3 fil-Figura 1. Meta dan mhux possibbli, θ_{SC} jista' jiġi kkalkulat, flimkien ma' valuri approssimattivi μ_m u K_S, bl-immarkar ta' S_1, vs. $S_1 \bullet \theta_S$.

Arranġament mill-ġdid tal-ekwazzjoni (1) jagħti

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

Jekk K_d jkun żgħir, allura $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ u [5] isir:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Għalhekk, il-grafika għandha tkun linja dritta (ara l-Figura 2) tal-anglu $1/\mu_m$ u l-interċezzjoni K_S/μ_m; ukoll $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figura 1

Tliet temperaturi; ħames SRTs

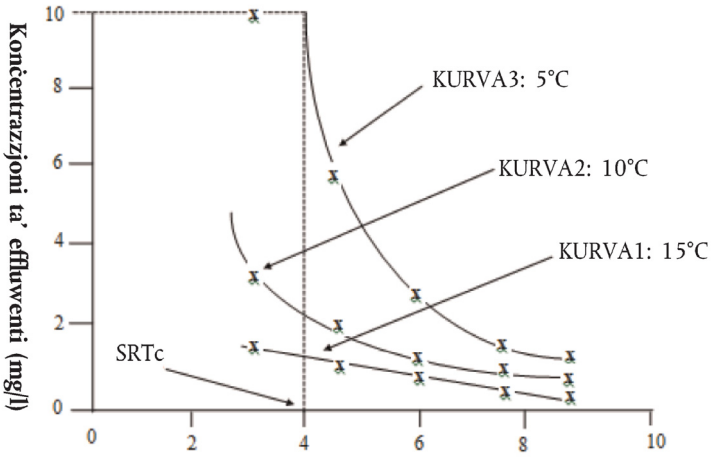
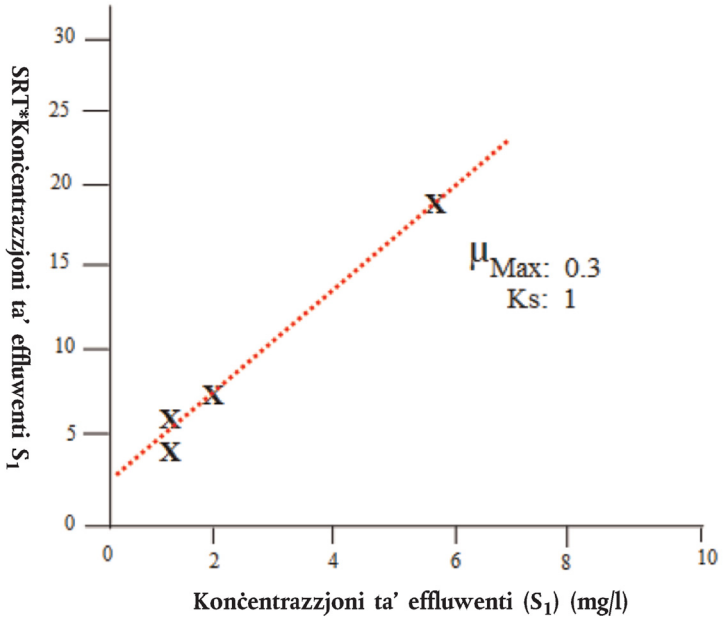


Figura 2

Linja ta' Rigressjoni SRT S_1 vs S_1 fuq T = 5 °C



Glossarju:

Konċentrazzjoni ta' effluwenti:

Kurva:

▼M4

Appendiċi 7

TEST F'FIRXA TA' (μg/l) KONĊENTRAZZJONI BAXXA

1. Ħafna kimiċi normalment ikunu jinsabu fl-ambjent akwatiku, f'ilmijiet mormija wkoll, f'konċentrazzjonijiet baxxi ħafna (μg/l). F'konċentrazzjonijiet bħal dawn probabbli li dawn ma jservux bħala substrati primarji li jirriżultaw fi tkabbir, iżda x'aktarx li jiddegradaw f'substrati sekondarji, mingħajr tkabbir, fl-istess żmien ma' varjetà ta' kimiċi tal-karbonju li jseħħu b'mod naturali. Għaldaqstant id-degradazzjonijiet ta' kimiċi bħal dawn ma jkunux jaqblu mal-mudell deskritt fl-Appendiċi 6. Hemm ħafna mudelli li jistgħu jkunu applikati u, skont il-kondizzjonijiet li jkun hemm f'sistemi ta' trattament ta' ilma mormi, aktar minn wieħed jista' jkun simultanjament operattiv. Tkun meħtieġa ħafna aktar riċerka biex titfa' dawl fuq din il-problema.

2. Sadattant tista' tkun segwita l-proċedura mogħtija fit-test prinċipali (il-Kapitolu C.10 A), iżda għall-bijodegradabbiltà primarja biss, billi jintużaw konċentrazzjonijiet baxxi adatti (< 100 μg/l) u proċedura analitika vvalidata. Il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni jista' jkun ikkalkulat (ara para. 54 tal-Metodu ta' Ttestjar) iżda għandhom jitqiesu proċessi abijotiċi (sorbiment, volatilità, eċċ.). Eżempju huwa l-istudju ta' Nyholm u sħabu (1)(2) li użaw ċiklu ta' 4 sigħat f'sistema ta' kuntatt. Irrapportaw kostanti psewdo tal-ewwel ordni għal 5 kimiċi miżjuda f'dranaġġ sintetiku f'5 sa 100μg/l. (Għall-aħħar bijodegredabbiltà l-kimiċi għall-ittestajr bit-tikketta ^{14}C jistgħu jintużaw. Deskrizzjoni ta' dan tmur lil hinn mill-kamp ta' applikazzjoni ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar minħabba li s'issa għad m'hemmx proċeduri maqbula, għalkemm metodu propost għal ISO 14592 (3) għandu gwida dwar l-użu ta' kimiċi bit-tikketta ^{14}C

Test SCAS

3. Wara kien propost test aktar sempliċi f'żewġ stadji (4)(5)(6); il-metodu ta' ħama attivat nofsu kontinwu (SCAS) ikun segwit minn testijiet kinetiċi għal żmien qasir fuq kampjuni meħudin minn unitajiet ta' SCAS. Is-sistema SCAS titħaddem b'rati ta' rimi ta' ħama magħrufin (mhux bħal metodu oriġinali tat-test C.12) u jiddaħħlilha dranaġġ sintetiku tal-OECD modifikat jew dranaġġ domestiku. Id-dranaġġ sintetiku kien immodifikat (minħabba bdil fil-valur tal-pH u ħama bi ftit sedimentazzjoni) biż-żieda ta' fosfat bħala lqugħ, estratt ta' ħmira, klorur tal-ħadid (III) u traċċa ta' element ta' melħ u COD tiegħu miżjud għal madwar 750 mg/l billi żdiedet il-konċentrazzjoni ta' peptun u estratt tal-laħam. L-unitajiet tħaddmu f'ċiklu ta' 24 siegħa: tirwiħ għal 23 siegħa, rimi ta' ħama, sedimentazzjoni, rtirar ta' supernatant (effluwent) u kien segwit b'żieda ta' dranaġġ sintetiku flimkien ma' kimika għall-ittestjar, sa 100 μg/l, (jiġifieri f'madwar l-istess konċentrazzjoni użata fit-test għal żmien qasir). Darba fil-ġimgħa 10 % tat-total ta' ħama nbidel b'ħama frisk biex tinżamm massa mikrobika bilanċjata.

4. Il-konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar jitkejlu fil-bidu u fi tmiem tirwiħ u t-test jitkompla sakemm tinkiseb tneħħija kostanti ta' kimika għall-ittestjar; dan jieħu minn ġimgħa sa diversi xhur.

Test għal żmien qasir

5. Ikun applikat test qasir (eż. 8 sigħat) biex ikun iddeterminat il-kostant ta' rata kinetika tal-ewwel grad (psewdo) għad-diżintegrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'ħama attivat ta' oriġinijiet u stejjer magħrufin iżda differenti. B'mod partikolari, jittieħdu kampjuni ta' ħama mir-reatturi ta' SCAS fit-tmiem ta' perjodu ta' tirwiħ meta l-konċentrazzjoni ta' substrat organiku tkun baxxa - matul il-perkors ta' esperiment ta' akklimatazzjoni (paragrafi 3, 4). Ħama jista' jittieħed ukoll minn unità parallela ta' SCAS li ma tkunx

▼M4

esposta għall-kimika għall-ittestjar, biex jitqabbel. Taħlitiet ta' ħama u l-kimika għall-ittestjar miżjuda f'żewġ konċentrazzjonijiet jew aktar fil-firxa 1-50 μg/l jitrewħu, mingħajr ma jiżdied dranaġġ sintetiku jew substrat organiku ieħor. il-kimika għall-ittestjar li tifdal f'soluzzjoni tkun iddeterminata f'intervalli regolari, eż. kull siegħa skont kemm tkun degradabbli l-kimika, għal perjodu mhux itwal minn 24 siegħa. Kampjuni jkunu ssoġġettati għal azzjoni ċentrifuga qabel analiżi xierqa.

Kalkulazzjonijiet

6. Dejta mill-unitajiet ta' SCAS tintuża biex ikun ikkalkulat il-perċentwali ta' tneħħija ta' kimika għall-ittestjar (paragrafu 54). Kostant ta' rata medja, K_1, (innormalizzat għal konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi) jista' wkoll ikun ikkalkulat minn:

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

fejn:

t = ħin ta' tirwiħ (23h)

C_e = konċentrazzjoni fi tmiem ta' perjodu ta' tirwiħ (μg/l)

C_i = konċentrazzjoni fil-bidu ta' tirwiħ (μg/l)

SS = konċentrazzjoni ta' solidi ta' ħama attivat (g/l)

7. Fit-test għal żmien qasir il-konċentrazzjoni log % li jifdal tkun immarkata skont il-ħin, u l-anglu tal-parti tal-bidu (10-50 % degradazzjoni) tal-grafika jkun ekwivalenti għal K_1, il-kostant tal-ewwel grad (psewdo). Il-kostant ikun innormalizzat fir-rigward tal-konċentrazzjoni ta' solidi ta' ħama billi l-anglu jkun diviż bil-konċentrazzjoni ta' solidi ta' ħama. Ir-riżultat irrapportat għandu jinkludi wkoll dettalji ta' konċentrazzjonijiet tal-bidu tal-kimika għall-ittestjar u solidi sospiżi, żmien ta' ritenzjoni ta' ħama, tagħbija u sors ta' ħama, u dettalji ta' espożizzjoni minn qabel (jekk ikun hemm) għall-kimika għall-ittestjar.

Varjabbiltà ta' riżultati

8. Il-varjabbiltà u aspetti oħra ta' bijodegradazzjoni kinetika kienu diskussi f'workshop riċenti ta' SETAC (7). Minn studji bħal dawn, rapportati u proġettati, għandha toħroġ ma ddumx stampa aktar ċara ta' kinetika li topera f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi biex tgħin ikun hemm interpretazzjoni aħjar ta' dejta eżistenti, kif ukoll biex tissuġġerixxi disinji aktar rilevanti għal Metodi ta' Ttestjar fil-ġejjieni.

LETTERATURA:

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT u Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Bijoriti

DAĦLA

1. Testijiet ta' simulazzjoni normalment ikunu applikati għal kimiċi li ma jkunux għaddew minn test ta' tgħarbil għal bijodegradabbiltà faċli (il-Kapitolu C.4 A sa F ta' dan l-Anness (9)), iżda li jkunu għaddew minn test għal bijodegradabbiltà inerenti. B'mod eċċezzjonali t-testijiet ta' simulazzjoni jiġu applikati wkoll għal kwalunkwe kimika li dwarha tkun meħtieġa iktar informazzjoni, speċjalment kimiċi ta' ħafna tunnellati, u normalment jiġi applikat it-test tal-ħama attivat (C.10 A). F'xi ċirkostanzi, madankollu, tkun meħtieġa informazzjoni speċifika marbuta mal-aġir ta' kimika mal-metodi tat-trattament tal-ilma mormi inkluż bijoriti, l-katar filtri li jnixxu jew li jqattru, kontatturi bijoloġiċi li jduru, sodod fluwidizzati. Biex din il-ħtieġa tintlaqa' kienu żviluppati diversi apparati.

2. Gerike *et al*. (1) użaw filtri li jqattru kbar fuq skala pilota li ġew utitlizzati fil-mudell akkoppjat. Dawn il-filtri ħadu ħafna spazju u kienu jeħtieġu volumi relattivament kbar ta' dranaġġ jew dranaġġ sintetiku. Truesdale *et al*. (2) iddeskrivew filtri iżgħar (6 piedi x 6 pulzieri dijametru) li għaddewlhom dranaġġ naturali mingħajr tensjoattivi iżda li x'aktarx kienu għadhom jeħtieġu volumi kbar. Kienu meħtieġa mhux anqas minn 14-il ġimgħa biex kienet żviluppata bijorita "matura" u kienu jeħtieġu minn 4 sa 8 ġimgħat oħra wara li ddaħħal għall-ewwel darba t-tensjoattiv tat-test qabel ma saret akklimatazzjoni.

3. Baumann *et al.* (3) żviluppaw filtru ħafna aktar iżgħar li uża "suf verġni" tal-poliester li qabel kien mgħaddas f'ħama attivat bħala l-midjum inerti li kien iżomm il-bijorita. il-kimika għall-ittestjar intużat bħala l-uniku sors ta' karbonju, u l-bijodegradabbiltà kienet ivvalutata minn kejlijiet ta' karbonju organiku maħlul (DOC) fl-influwent u fl-effluwent, u mill-ammont ta' CO_2 fil-gass li joħroġ.

4. Approċċ pjuttost differenti ittieħed minn Gloyna *et al.* (4) li vvintaw ir-reattur tubulari li jdur. Fuq il-wiċċ ta' ġewwa tat-tubu li jdur kienet tkabbret bijorita fuq l-erja magħrufa tal-wiċċ bil-passaġġ ta' influwent imdaħħal fit-tarf ta' fuq tat-tubu, inklinat f'angolu żgħir lejn l-orizzontali. Ir-reattur intuża biex tkun studjata l-bijodegradabbiltà ta' tensjoattivi (5), kif ukoll biex tkun mistħarrġa l-aħjar ħxuna ta' bijorita u tixrid mir-rita (6). Dawn l-awturi tal-aħħar żviluppaw ulterjorment ir-reattur, inkluż li mmoddifikawh biex ikun jista' jiddetermina CO_2 fil-gass li joħroġ.

5. Ir-reattur tubulari li jdur kien adottat mill-Kumitat Permanenti ta' Analisti (UK) bħala metodu standard għall-valutazzjoni kemm tal-bijodegradabbiltà ta' kimiċi (7) kif ukoll tat-trattabbiltà u tat-tossiċità ta' ilmijiet mormija (8). Il-metodu deskritt hawnhekk għandu l-vantaġġi tas-sempliċità, il-kumpattezza, ir-riproduċibbiltà u l-ħtieġa għal volumi relattivament żgħar ta' midjum organiku.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Dranaġġ sintetiku jew domestiku, u l-kimika għall-ittestjar, f'taħlita jew waħedhom, ikunu applikati fuq il-wiċċ ta' ġewwa ta' tubu inklinat li jdur bil-mod. Saff ta' mikroorganiżmi, jixbhu lil dawk li jkun hemm fuq midja ta' bijofiltri, jinbena fuq il-wiċċ ta' ġewwa. Il-kondizzjonijiet ta' tħaddim tar-reattur jintgħażlu biex jeliminaw b'mod adegwata materja organika u, jekk ikun meħtieġ, ossidazzjoni tal-ammonju.

▼M4

7. Effluwent mit-tubu jinġabar u jew joqgħod u/jew jiġi ffiltrat qabel analiżi għal karbonju organiku maħlul (DOC) u/jew għall-kimika għall-ittestjar b'metodu speċifiku. Unitajiet ta' kontroll li ma jirċievu ebda kimika għall-ittestjar jitħaddmu b'mod parallel bl-istess kondizzjonijiet għal għanijiet komparattivi. Id-differenza bejn il-konċentrazzjonijiet ta' DOC fl-effluwent u l-unitajiet ta' test u kontroll hija preżunta li tkun dovuta minħabba l-kimika għall-ittestjar u l-metaboliti organiċi tagħha. Din id-differenza titqabbel mal-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar miżjuda (bħala DOC) biex tkun ikkalkulata l-eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

8. Il-bijodegradazzjoni tista' normalment tingħaraf minn bijosorbiment b'eżami sewwa tal-kurva ta' eliminazzjoni-żmien/ħin. Konferma s-soltu tkun tista' tinkiseb billi jkun applikat test għal bijodegradazzjoni faċli (konsum ta' ossiġnu jew produzzjoni ta' diossidu tal-karbonju) billi tintuża tilqima akklimatizzata meħuda fit-tmiem tat-test mir-reatturi li jirċievu l-kimika għall-ittestjar.

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR

9. Il-purezza, is-solubilità fl-ilma, u l-karatteristiċi volatili u ta' sorbiment tal-kimika għall-ittestjar għandhom ikunu magħrufa biex jista' jkun hemm interpretazzjoni korretta tar-riżultati li jkollhom isiru.

10. Normalment, kimiċi volatili u li ftit jinħallu ma jistgħux ikunu t-testjati sakemm ma jitteħdux prekawzjonijiet speċjali (ara l-Appendiċi 5 tal-Kapitolu C.10 A). L-istruttura kimika, jew għall-anqas il-formula empirika, għandhom wkoll ikunu magħrufa biex ikunu kkalkulati valuri teoretiċi u/jew biex ikunu vverifikati valuri mkejla ta' parametri, eż. domanda teoretika ta' ossiġnu (ThOD), DOC.

11. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganiżmi (ara l-Appendiċi 4 tal-kapitolu C.10 A) jistgħu jkunu utli biex jintgħażlu konċentrazzjonijiet xierqa ta' testijiet u jistgħu jkunu essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri baxxi ta' bijodegradazzjoni.

LIVELLI TA' PASS

12. Oriġinarjament, il-bijodegradazzjoni primarja ta' aġenti tensjoattivi kien jeħtiġilha tilħaq 80 % jew aktar qabel ma l-kimika setgħet titqiegħed fis-suq. Jekk il-valur ta' 80 % ma jintlaħaqx, jista' jkun applikat dan it-test ta' simulazzjoni (konfermatorju) u t-tensjoattiv ikun jista' jitqiegħed fis-suq biss jekk titneħħa aktar minn 90 % tal-kimika speċifika. Għal kimiċi inġenerali mhix kwistjoni ta' livell ta' jekk ikunx hemm pass/falliment u l-valur ta' perċentwali ta' tneħħija jista' jintuża f'kalkulazzjonijiet prossimi tal-konċentrazzjoni ambjentali probabbli biex jintuża fi stimi tal-perikli li jġibu kimiċi. F'għadd ta' studji ta' kimiċi puri l-perċentwali ta' tneħħija ta' DOC instab li kien > 90 % f'aktar minn tliet kwarti, u > 80 % f'aktar minn 90 %, ta' kimiċi li wrew xi grad sinifikanti ta' bijodegradabbiltà.

KIMIĊI TA' REFERENZA

13. Biex ikun żgurat li l-proċedura sperimentali tkun qed titwettaq b'mod korrett, ikun utli kull tant żmien li jkunu ttestjati kimiċi ta' referenza li mġibthom tkun magħrufa. Kimiċi bħal dawn jinkludu aċidu adipiku, 2-fenil fenol, 1-naftol, aċidu "difeniku" u aċidu 1-naftoiku.

RIŻULTATI RIPRODUĊIBBLI TAT-TESTIJIET

14. Id-devjazzjoni standard relattiva f'testijiet instabet mil-laboratorju fir-Renju Unit li kienet ta' 3,5 % u li bejn testijiet kienet ta' 5 % (7).

▼M4

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

Reatturi tubi li jduru

15. L-apparat (ara l-figuri 1 u 2 fl-Appendiċi 8) jikkonsisti minn sodda ta' tubi tal-akrilik kull wieħed 30,5 cm twil u 5 cm dijametru intern, appoġġat fuq roti tal-lasktu li jkunu ġo qafas ta appoġġ tal-metall. Kull tubu għandu xoffa, madwar 0,5 cm fonda, biex iżżommu fuq ir-roti, il-wiċċ intern huwa magħmul aħrax bil-wire wool raff, u hemm xoffa interna fond 0,5 cm fit-tarf ta' fuq (għalf) biex iżżomm il-likwidu. It-tubi huma inklinati f'angolu ta' madwar grad wieħed lejn l-orrizont biex jiksbu l-ħin tal-kuntatt meħtieġ meta il-midjum tat-test jiġi applikat għal tubu nadif. Ir-roti bil-lakstu jiddawru b'mutur ta' veloċità varjabbli, bil-mod. It-temperatura tat-tubi tiġi kkontrollata b'installazzjoni f'kamra li għandha temperatura kostanti.

16. Billi kull reattur tubu jingħalaq ġewwa tubu ftit akbar, bil-għatu u jkun żgurat li ma jkunx jista' joħroġ gass mill-konnessjonijiet, gass CO_2 li joħroġ ikun jista' jinġabar f'soluzzjoni ta' alkalina għal kejl sussegwenti (6).

17. Provvista ta' 24 siegħa, għal kull tubu, ta' midjum organiku b'kimika għall-ittestjar miżjuda jekk applikabbli, titqiegħed f'reċipjent ta' ħżin (A) ta' 20 l (A) (ara l-Figura 2). Jekk ikun meħtieġ, is-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar tista' tiġi ddożata separatament. Qrib il-qiegħ ta' kull reċipjent ta' ħżin ikun hemm fetħa li tkun ikkunnettjata b'sistema adatta ta' tubi, eż. lastku tas-silikon, permezz ta' pompa peristaltika (B), ma' tubu ta' ħruġ magħmul mill-ħġieġ jew silikon li jidħol minn 2 sa 4 cm fit-tarf ta' fuq (għalf) tat-tubu inklinat (C). L-effluwent jitħalla jqattar mit-tarf ta' isfel tat-tubu inklinat biex jinġabar f'reċipjent ieħor ta' ħżin (D). L-effluwent għandu joqgħod jew ikun iffiltrat qabel analiżi.

Apparat ċentrifugu ta' filtrazzjoni

18. Ikun hemm apparat għal filtrazzjoni ta' kampjuni b'filtru ta' membrani ta' porożità adatta (dijametru ta' apertura nominali ta' 0,45 μm) li jassorbi kimiċi organiċi jew li jerħi karbonju organiku għal grad minimu. Jekk jintużaw filtri li jerħu karbonju organiku, aħsilhom sewwa b'ilma sħun biex tneħħi karbonju organiku li jlissi. Alternattivament jista' jintuża ċentrifugu li jkun kapaċi jagħmel 40 000 m/sec^2.

19. Tagħmir analitiku biex ikun iddeterminat:

— DOC/karbonju organiku totali (TOC) jew domanda kimika ta' ossiġnu (COD);

— kimika speċifika (HPLC, GC, eċċ.) jekk tkun meħtieġa;

— pH, temperatura, aċidità, alkalinità;

— ammonju, nitrit, nitrat, jekk it-testijiet isiru f'kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni.

Ilma

20. Ilma tal-vit, li jkun fih anqas minn 3 mg/l DOC.

21. Ilma distillat jew dejonizzat, li jkun fih anqas minn 2 mg/l DOC.

▼M4

Midjum organiku

22. Jista' jintuża dranaġġ sintetiku, dranaġġ domestiku jew taħlita tat-tnejn bħala l-midjum organiku. Intwera li l-użu ta' dranaġġ domestiku waħdu sikwit jagħti perċentwali ogħla ta' tneħħija ta' DOC (f'unitajiet ta' ħama attivat) u jħalli wkoll li jkun hemm bijodegradazzjoni ta' xi kimiċi, li ma jiġux iddegradati bijoloġikament meta jintuża dranaġġ sintetiku tal-OECD. Għal-hekk huwa rrakkomandat l-użu ta' dranaġġ domestiku. Kejjel il-konċentrazzjoni ta' DOC (jew COD) f'kull lott ġdid ta' midjum organiku. L-aċidità jew l-alkalinità tal-midjum organiku għandha tkun magħrufa. Il-midjum jista' jeħtieġ li jiżdiedlu lquġħ xieraq (idroġenu karbonat tas-sodju jew fosfat tal-idroġenu tal-potassju), jekk ikun ta' aċidità jew alkalinità baxxi, biex jinżamm pH ta' dwar 7,5 + 0,5 fir-reattur matul it-test. L-ammont ta' lquġħ, u meta għandu jiżdied, għandhom ikunu deċiżi każ każ.

Dranaġġ sintetiku

23. Ħoll f'kull litru ilma tal-vit: peptun, 160 mg; estratt tal-laħam, 110 mg; urea, 30 mg; fosfat anidru tal-idroġenu tad-dipotassju (K_2HPO_4), 28 mg; klorur tas-sodju, (NaCl), 7 mg; klorur tal-kalċju diidrat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; sulfat tal-maġniżju eptaidrat ((Mg_4SO_2.7H20), 2 mg. Dan id-dranaġġ sintetiku tal-OECD huwa eżempju u jagħti konċentrazzjoni medja tad-DOC fl-influwent ta' madwar 100 mg/l. Alternattivament, uża kompożizzjonijiet oħrajn, b'madwar l-istess konċentrazzjoni tad-DOC, li huma eqreb għad-dranaġġ reali. Dan id-dranaġġ sintetiku jista' jsir f'ilma ddistillat f'forma kkonċentrata u jinħażen f'madwar 1 °C sa mhux aktar minn ġimgħa. Meta jkun hemm bżonnu, raqqu bl-ilma tal-vit. (Dan il-midjum mhux sodisfaċenti, eż. il-konċentrazzjoni ta' nitroġenu hija għolja ħafna, relattivament b'kontenut ta' karbonju baxx, iżda ma kien issuġġerit xejn aħjar, ħlief li jiżdied aktar fosfat bħala lquġħ u peptun żejjed).

Dranaġġ domestiku

24. Uża dranaġġ qiegħed frisk miġbur kuljum minn xogħlijiet ta' trattament li jirċievu b'mod predominanti dranaġġ domestiku. Dan għandu jinġabar mill-kanal tat-tifwir tat-tank ta' sedimentazzjoni primarja, jew mill-għalf għall-impjant tal-ħama attivat, u jkun kważi kollu ħieles minn partiċelli raffi. Id-dranaġġ ikun jista' jintuża wara l-ħżin għal diversi jiem f'madwar 4 °C, jekk ikun ippruvat li DOC (jew COD) ma jkunux naqsu b'mod sinifikanti (jiġifieri b'anqas minn 20 %) matul ħżin. Biex ikun illimitat taqlib fis-sistema, DOC (jew COD) ta' kull lott ġdid għandhom ikunu aġġustati qabel ma jintużaw għal valur kostanti xieraq, eż. b'dilwizzjoni bl-ilma tal-vit.

Lubrikant

25. Jistgħu jintużaw gliċerol jew żejt taż-żebbuġa għal-lubrikazzjoni tar-rombli tal-pompa peristaltika: it-tnejn huma tajbin biex jintużaw fuq tubi tal-lastku tas-silikon.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' kimika għall-ittestjar

26. Għal kimiċi li jinħallu b'mod adegwat ħejji soluzzjonijiet ta' stokkijiet f'konċentrazzjonijiet xierqa (eż. 1 sa 5 g/l) f'ilma dejonizzat jew fil-porzjon minerali tad-dranaġġ sintetiku. Għall-kimiċi li ma jinħallux, ara l-Appendiċi 5 fil-kapitolu C.10-A. Dan il-metodu mhux tajjeb għal kimiċi volatili mingħajr modifiki għar-reatturi tubu (paragrafu 16). Iddetermina DOC u TOC tas-soluzzjoni ta' stokkijiet u tenni l-kejlijiet għal kull lott ġdid. Jekk id-differenza bejn DOC u TOC tkun aktar minn 20 %, ivverifika jekk il-kimika għall-ittestjar tinħallx fl-ilma. Qabbel DOC jew il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar imkejla b'analiżi speċifika tas-soluzzjoni ta'

▼M4

stokkijiet mal-valur nominali biex taċċerta jekk l-irkupru jkunx tajjeb biżżejjed (normalment jista' jkun mistenni > 90 %). Aċċerta, l-aktar għal tixrid, jekk jistax jintuża DOC jew le bħala parametru analitiku jew jekk tistax tintuża biss teknika analitika b'mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar. Ċentrifugazzjoni tal-kampjuni tkun meħtieġa għal tixrid. Għal kull lott ġdid, kejjel DOC, COD jew il-kimika għall-ittestjar ma' analiżi speċifika.

27. Iddetermina pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Valuri estremi jindikaw li żżieda tal-kimika jista' jkollha influwenza fuq pH tal-ħama attivat fis-sistema ta' ttestjar. F'dan il-każ innewtralizza s-soluzzjoni ta' stokkijiet biex tikseb pH ta' 7 ± 0,5 b'ammonti żgħar ta' aċidu jew bażi inorganiċi, iżda evita l-preċipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

PROĊEDURA

Tħejjija ta' midjum organiku għal dożar

28. Żgura li kontenituri ta' influwenti u effluwenti u tubi minn reċipjenti ta' influwenti u għal reċipjenti ta' effluwenti jitnaddfu sewwa biex tneħħi tkabbir mikrobiku, fil-bidu u matul it-test kollu.

29. Ħejji d-dranaġġ sintetiku (paragrafu 23) frisk kuljum mis-solidi jew mis-soluzzjoni konċentrata ta' stokkijiet b'dilwizzjoni adatta b'ilma tal-vit. Kejjel l-ammont meħtieġ f'ċilindru u żid f'reċipjent nadif ta' influenti. Jekk ikun meħtieġ, żid ukoll l-ammont meħtieġ tas-soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar jew tal-kimika ta' referenza mad-dranaġġ sintetiku qabel id-dilwizzjoni. Jekk ikun aktar konvenjenti jew ta' ħtieġa biex ikun evitat telf tal-kimika għall-ittestjar, ħejji soluzzjoni separata dilwita tal-kimika għall-ittestjar f'riżerva separata u għaddi din fit-tubi inklinati permezz ta' pompa differenti tad-dożaġġ.

30. Alternattivament (u preferibbilment), uża dranaġġ qiegħed domestiku (paragrafu 24) miġbur frisk kuljum jekk ikun possibbli.

Tħaddim ta' reatturi tubi li jduru

31. Ikunu meħtieġa żewġ reatturi tubi identiċi għall-valutazzjoni ta' kimika waħda ta' ttestjar, u jitgħaqqdu f'kamra b'temperatura kostanti normalment ta' 22 ± 2 °C.

32. Aġġusta l-pompi peristaltiċi biex iwasslu 250 ± 25 ml/h tal-midjum organiku (mingħajr kimika għall-ittestjar) fit-tubi inklinati, li jiddawru bi 18 ± 2 rpm. Applika l-lubrikant (paragrafu 25) lit-tubi tal-pompa fil-bidu u perjodikament permezz tat-test biex tiżgura funzjonament sewwa u biex ittawwal il-ħajja tas-sistema tat-tubi.

33. Aġġusta l-angolu tax-xaqliba tat-tubi mal-orizzontali biex tipproduċi żmien ta' residenza ta' 125 ± 12,5 kull sekonda għall-għalf f'tubu nadif. Agħmel stima taż-żmien ta' ritenzjoni billi żżid marka mhux bijoloġika (eż. NaCl, kulurant inerti) lill-għalf: iż-żmien li l-konċentrazzjoni tieħu biex tilħaq l-aqwa tagħha fl-effluwent jitqies li jkun il-żmien medju ta' retenzjoni (meta jkun hemm rita massima, iż-żmien ta' ritenzjoni jista' jiżdied sa madwar 30 minuta).

34. Dawn ir-rati, veloċitajiet u ħinijiet instabu li jneħħu b'mod adegwat (> 80 %) ta' DOC (jew ta' COD) u li jipproduċu effluwenti nitrifikati. Ir-rata ta' fluss għandha tinbidel jekk tneħħija ma tkunx suffiċjenti jew jekk il-prestazzjoni ta' impjant partikolari ta' trattament ikollha tkun issimulata. F'dan il-każ tal-aħħar, aġġusta r-rata ta' dożar tal-midjum organiku sakemm il-prestazzjoni tar-reattur tkun taqbel ma' dik tal-impjant ta' trattament.

▼M4

Tilqim

35. Tilqim li jinġarr mal-arja jista' jkun suffiċjenti biex jinbeda t-tkabbir ta' mikroorganiżmi meta jintuża dranaġġ sintetiku, iżda minbarra dak żid 1 ml/l ta' dranaġġ qiegħed mal-għalf għal 3 ijiem.

Kejl

36. F'intervalli regolari ara li r-rati ta' doża u l-voloċitajiet ta' tidwir ikunu fil-limiti meħtieġa. Kejjel ukoll il-pH tal-effluwent, l-aktar jekk tkun mistennija nitrifikazzjoni.

Teħid ta' kampjuni u analiżi

37. Il-metodu, xejra u frekwenza ta' teħid ta' kampjuni jintgħażlu biex ikunu adatti għall-fini tat-test. Pereżempju, ħu kampjuni każwali (jew f'daqqa) kampjuni ta' influwent u effluwent, jew iġbor kampjuni tul perjodu itwal, eż. 3-6 sigħat. Fl-ewwel perjodu, mingħajr kimika għall-ittestjar, ħu kampjuni darbtejn fil-ġimgħa. Iffiltra l-kampjuni minn membrani jew ċentrifugu f'madwar 40 000 m/sec^2 għal madwar 15-il minuta (paragrafu 18). Jista' jkun hemm il-ħtieġa li l-kampjuni joqogħdu u/jew li jkunu ffiltrati b'mod raff qabel il-filtrazzjoni b'membrani. Iddetermina DOC (jew COD) mill-anqas b'mod duplikat u, jekk ikun meħtieġ, BOD, ammonju u nitrit/-nitrat.

38. Kull analiżi għandha ssir malajr kemm jista' jkun wara l-ġbir u t-tħejjija tal-kampjuni. Jekk analiżi jkollha tiġi posposta, aħżen il-kampjuni f'madwar 4 °C fid-dlam fi fliexken mimlijin u magħluqin issikkati. Jekk kampjuni jkollhom jinħażnu għal aktar minn 48 siegħa, ippreservahom fil-friża, b'aċidifikazzjoni jew biż-żieda ta' kimika tossika adatta (eż. 20 ml/l ta' soluzzjoni ta' 10 g/l ta' klorur tal-merkurju (II)). Żgura li t-teknika ta' preservazzjoni ma tinfluwenzax ir-riżultati ta' analiżi.

Perjodu tal-bidu (running-in)

39. F'dan il-perjodu, il-bijorita tal-wiċċ tikber biex tilħaq l-aħjar ħxuna, li s-soltu tieħu madwar ġimagħtejn u m'għandhiex tieħu aktar minn 6 ġimgħat. It-tneħħija (paragrafu 44) ta' DOC (jew ta' COD) tiżdied u tilħaq valur ta' livell kostanti. Meta l-fażi ta' livell kostanti tintlaħaq f'valur simili fiż-żewġ tubi, jintgħażel wieħed biex ikun ta' kontroll fil-bqija tat-test, li matulu l-prestazzjoni tagħhom għandha tibqa' konsistenti.

Dħul ta' kimika għall-ittestjar

40. F'dan l-istadju żied il-kimika għall-ittestjar mar-reattur l-ieħor fil-konċentrazzjoni meħtieġa, normalment 10-20 mg C/l. Il-kontroll ikompli jirċievi l-midjum organiku waħdu.

Perjodu ta' akklimatazzjoni

41. Kompli bl-analiżi darbtejn fil-ġimgħa għal DOC (jew COD) u, jekk ikollha tkun ivvalutata l-bijodegradabbiltà primarja, kejjel ukoll il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar b'analiżi speċifika. Ħalli minn ġimgħa sa sitt ġimgħat (jew aktar f'kondizzjonijiet speċjali) wara li l-kimika għall-ittestjar tkun iddaħħlet għall-ewwel darba biex isseħħ akklimatazzjoni. Meta l-perċentwali ta' tneħħija (paragrafi 43-45) jilħaq valur massimu, ikseb valuri validi minn 12-15 fil-fażi ta' livell kostanti tul madwar 3 ġimgħat għal evalwazzjoni tal-perċentwali medja ta' tneħħija. It-test jitqies lest jekk jintlaħaq grad għoli biżżejjed ta' eliminazzjoni. Normalment, taqbiżx żmien ta' 12-il ġimgħa ta' kemm idum test wara l-ewwel żieda tal-kimika għall-ittestjar.

▼M4

Ħrif tar-rita

42. It-tneħħija f'daqqa ta' kwantitajiet kbar ta' rita żejda mit-tubi, jew ħrif, isseħħ relattivament f'intervalli regolari. Biex tiżgura li ma tkunx affettwata l-komparabbiltà ta' riżultati, ħalli t-testijiet ikopru mill-anqas żewġ ċikli kbar ta' tkabbir u ħrif.

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

43. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC (jew ta' COD) tal-kimika għall-ittestjar għal kull valutazzjoni li jkun itteħdilha l-ħin billi tuża l-ekwazzjoni:

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

fejn

D_t = perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC (jew ta' COD) f'ħin t;

Cs = konċentrazzjoni ta' DOC (jew ta' COD) fl-influwent minħabba l-kimika għall-ittestjar, preferibbilment stmata mill-konċentrazzjoni fi, u mill-volum miżjud, tas-soluzzjoni ta' stokkijiet (mg/l);

E = DOC (jew COD) mkejla fl-effluwent tat-test f'ħin t (mg/l);

Eo = DOC (jew COD) mkejla fl-effluwent tal-kontroll f'ħin t (mg/l).

Tenni l-kalkulazzjoni għall-kimika ta' referenza, jekk ittestjata.

Prestazzjoni tar-reattur ta' kontroll

44. Il-grad ta' eliminazzjoni (D_B) ta' DOC (jew ta' COD) tal-midjum organiku fir-reattur ta' kontrolli huwa informazzjoni utli biex tkun ivvalutata l-attività bijodegradattiva tal-bijorita matul it-test. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni bl-ekwazzjoni:

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

fejn

Cm = DOC (jew COD) tal-midjum organiku fl-influwent tal-kontroll (mg/l).

45. Ikkalkula t-tneħħija (D_{ST}) tal-kimika għall-ittestjar, jekk titkejjel, b'metodu analitiku speċifiku f'valutazzjoni ta' kull darba bl-ekwazzjoni:

$$DST = 100(1 - Se/Si)\ \%$$

fejn

Si = konċentrazzjoni mkejla jew, preferibbilment, stmata ta' kimika għall-ittestjar fl-influwent tat-test (mg/l)

Se = konċentrazzjoni mkejla tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent tat-test f'ħin t (mg/l)

▼M4

Jekk il-metodu analitiku jagħti valur pożittiv f'ekwivalenti ta' dranaġġ mhux mibdul għal S_c mg/l, ikkalkula l-perċentwali ta' tneħħija (D_{SC}) minn:

$$DSC = 100(Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Espressjoni ta' riżultati tat-testijiet

46. Immarka l-perċentwali ta' eliminazzjoni D_t u D_{ST} (jew D_{SC}), jekk ikunu disponibbli, kontra l-ħin (ara l-Appendiċi 2 fil-Kapitolu C.10- A). Ħu l-medja (espressa sal-eqreb numru sħiħ) u l-istandard ta' devvjazzjoni tal-valuri 12-15 għal D_T (u għal D_{ST}, jekk ikunu disponibbli) miksubin fil-fażi ta' livell kostanti bħala l-perċentwali ta' tneħħija tal-kimika għall-ittestjar. Mill-forma tal-kurva ta' eliminazzjoni, jistgħu jinstiltu xi konklużjonijiet dwar il-proċessi ta' tneħħija.

Sorbiment

47. Jekk tkun osservata eliminazzjoni għolja ta' DOC tal-kimika għall-ittestjar fil-bidu tat-test, il-kimika għall-ittestjar aktarx tkun eliminata b'sorbiment għal fuq il-bijorita. Jista' jkun possibbli li dan jiġi ppruvat permezz ta' diterminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar assorbita fuq solidi ħrif mir-riti. Mhux normali għall-eliminazzjoni tad-DOC ta' kimiċi assorbiti li jibqgħu għoljin matul it-test kollu; normalment, ikun hemm fil-bidu grad għoli ta' tneħħija li bil-mod il-mod jinżel għal valur ta' ekwilibriju. Iżda jekk il-kimika għall-ittestjar assorbita setgħet ikkawżat akklimatazzjoni tal-massa mikrobika, l-eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar DOC sussegwentement għandha tiżdied u tilħaq livell kostanti għoli.

Fażi ta' intervalli

48. Bħal f'dawk statiċi, f'testijiet ta' tgħarbil ħafna kimiċi għall-ittestjar jeħtieġu fażi ta' intervalli qabel ma sseħħ bijodegradazzjoni sħiħa. Fil-fażi ta' intervalli, akklimatazzjoni (jew adattament) tal-batterja kompetenti sseħħ mingħajr ma kważi titneħħa l-kimika għall-ittestjar; mbagħad iseħħ it-tkabbir tal-bidu ta' dawn il-batterji. Din il-fażi tintemm u l-fażi ta' degradazzjoni titqies arbitrarjament li tkun bdiet meta jitneħħa madwar 10 % tal-ammont tal-bidu ta' kimika għall-ittestjar (wara li jkun tqies is-sorbiment, jekk iseħħ). Il-fażi ta' intervalli sikwit tkun varjabbli ħafna u bilkemm riproduċibbli.

Fażi ta' livell kostanti

49. Il-fażi ta' livell kostanti ta' kurva ta' eliminazzjoni f'test kontinwu hija ddefinita bħala dik il-fażi li fiha sseħħ id-degradazzjoni massima. Din il-fażi għandha ddum mill-anqas 3 ġimgħat u jkollha madwar 12-15-il valur validu mkejjel.

Grad medju ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar

50. Ikkalkula l-valur medju mill-valuri ta' eliminazzjoni D_t (u D_s, jekk ikunu disponibbli) tal-kimika għall-ittestjar fil-fażi ta' livell kostanti. Miġjub għaddritt sal-eqreb numru sħiħ (1 %), dan ikun il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Huwa wkoll irrakkomandat li jkun ikkalkulat l-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-valur medju. B'mod simili kkalkula l-grad medju (D_B) ta' eliminazzjoni tal-midjum organiku fir-reċipjent ta' kontroll.

▼M4

Indikazzjoni ta' bijodegradazzjoni

51. Jekk il-kimika għall-ittestjar ma tassorbix b'mod sinifikanti mill-bijorita u l-kurva ta' eliminazzjoni jkollha forma tipika ta' kurva ta' bijodegradazzjoni b'intervall, ta' fażijiet ta' degradazzjoni u ta' livell kostanti (paragrafi 48, 49), l-eliminazzjoni mkejla tista' kważi fiċ-ċert tkun attribwita lill-bijodegradazzjoni. Jekk tkun seħħet tneħħija inizjali għolja, it-test ta' simulazzjoni ma jkunx jista' jiddivrenzja bejn proċessi ta' eliminazzjoni bijoloġiċi u abijotiċi. F'każijiet bħal dawn, u f'każijiet oħra fejn ikun hemm xi dubju dwar il-bijodegradazzjoni (eż. jekk isir stripaġġ), analizza kimika għall-ittestjar assorbita fuq kampjuni tar-rita jew agħmel testijiet statiċi addizzjonali (tgħarbil) għall-bijodegradabbiltà ibbażati fuq parametri li jindikaw b'mod ċar proċessi bijoloġiċi. Testijiet bħal dawn huma l-metodi ta' konsum ta' ossiġnu (Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness D, E u F) (9) jew test li jkejjel il-produzzjoni ta' CO_2 (Kapitolu C.4-C ta' dan l-Anness) jew il-metodu Spazju Fuq) (10); uża bħala tilqima esposta minn qabel bijorita mir-reattur adatt.

52. Jekk kemm it-tneħħija ta' DOC, kif ukoll it-tneħħija ta' kimika speċifika jkunu tkejlu, differenzi sinifikanti (tal-ewwel ikunu anqas minn tal-aħħar) bejn il-perċentwali mneħħija jindikaw li kien hemm fl-effluwenti prodotti organiċi intermedji, li jistgħu jkunu aktar diffiċli li jiddegradaw; dawn għandhom ikun mistħarġa.

Validità ta' riżultati tat-testijiet

53. Qis it-test bħala validu jekk il-grad ta' eliminazzjoni (DB) ta' DOC (jew ta' COD) fl-unitajiet ta' kontroll ikun > 80 % wara ġimagħtejn ta' tħaddim u ma tkun saret ebda osservazzjoni mhux tas-soltu.

54. Jekk kimika (ta' referenza) bijodegradabbli faċilment tkun ġiet ittestjata, il-grad ta' bijodegradazzjoni għandu jkun > 90 % u d-differenza bejn valuri duplikati m'għandhiex tkun akbar minn 5 %. Jekk dawn iż-żewġ kriterji ma jitħarsux, eżamina mill-ġdid il-proċeduri sperimentali u/jew ikseb dranaġġ domestiku minn sors ieħor.

55. Bl-istess mod, differenzi bejn valuri ta' degradazzjoni minn unitajiet duplikati (jekk jintużaw) li jittrattaw kimika għall-ittestjar m'għandhomx ikunu differenti b'aktar minn 5 %. Jekk dan il-kriterju ma jitħarisx iżda t-tneħħija tkun għolja, kompli bl-analiżi għal tliet ġimgħat oħra. Jekk it-tneħħija tkun baxxa, stħarreġ l-effetti inibitorji tal-kimika għall-ittestjar jekk ma jkunux magħrufin u tenni t-test f'konċentrazzjoni aktar baxxa ta' kimika għall-ittestjar, jekk dak ikun fattibbli.

Rapport tat-test

56. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Kimika għall-ittestjar:

— dejta ta' identifikazzjoni;

— natura fiżika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi.

Kondizzjonijiet tat-test:

— kull modifika għas-sistema ta' ttestjar, l-aktar jekk ikunu ttestjati kimiċi li ma jinħallux jew ikunu volatili;

— tip ta' midjum organiku;

— proporzjon u natura ta' skart industrijali fid-dranaġġ, jekk jintużaw u jekk ikunu magħrufa;

— metodu ta' tilqim;

▼M4

— soluzzjoni ta' stokkijiet ta' kimiċi għall-ittestjar – kontenut ta' DOC (karbonju organiku maħlul) u TOC (karbonju organiku totali); kif titħejja, jekk ta' sospensjoni; konċentrazzjoni(jiet) użata/i tat-test, raġunijiet jekk ikunu 'l barra mill-firxa 10-20 mg/l DOC; metodu ta' żieda; data tal-ewwel żieda; kull bidla fil-konċentrazzjoni;

— ħin medju ta' retenzjoni idrawlika (b'ebda tkabbir); veloċità ta' rotazzjoni tat-tubu; angolu approssimattiv tax-xaqliba, jekk ikun possibbli;

— dettalji ta' ħrif; ħin u intensità;

— temperatura tat-test u firxa;

— tekniċi analitiċi użati.

Riżultati tat-testijiet:

— dejta mkejla kollha ta' DOC, COD, analiżi speċifika, pH, temperatura, kimiċi N, jekk rilevanti;

— id-dejta kollha kkalkolata ta' D_t (jew D_{tc}), D_B, D_{St} miksuba f'forma tabulari u l-kurvi ta' eliminazzjoni;

— informazzjoni dwar fażijiet ta' intervalli u ta' livelli kostanti, durata ta' testijiet, il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, tal-kimika ta' referenza (jekk ittestjata) u tal-midjum organiku (fl-unità ta' kontroll), flimkien ma' dejta ta' statistika u dikjarazzjonijiet dwar il-bijodegradabbiltà u l-validità tat-test;

— diskussjoni dwar ir-riżultati.

LETTERATURA:

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G u Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà "Faċli" A-F.

(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

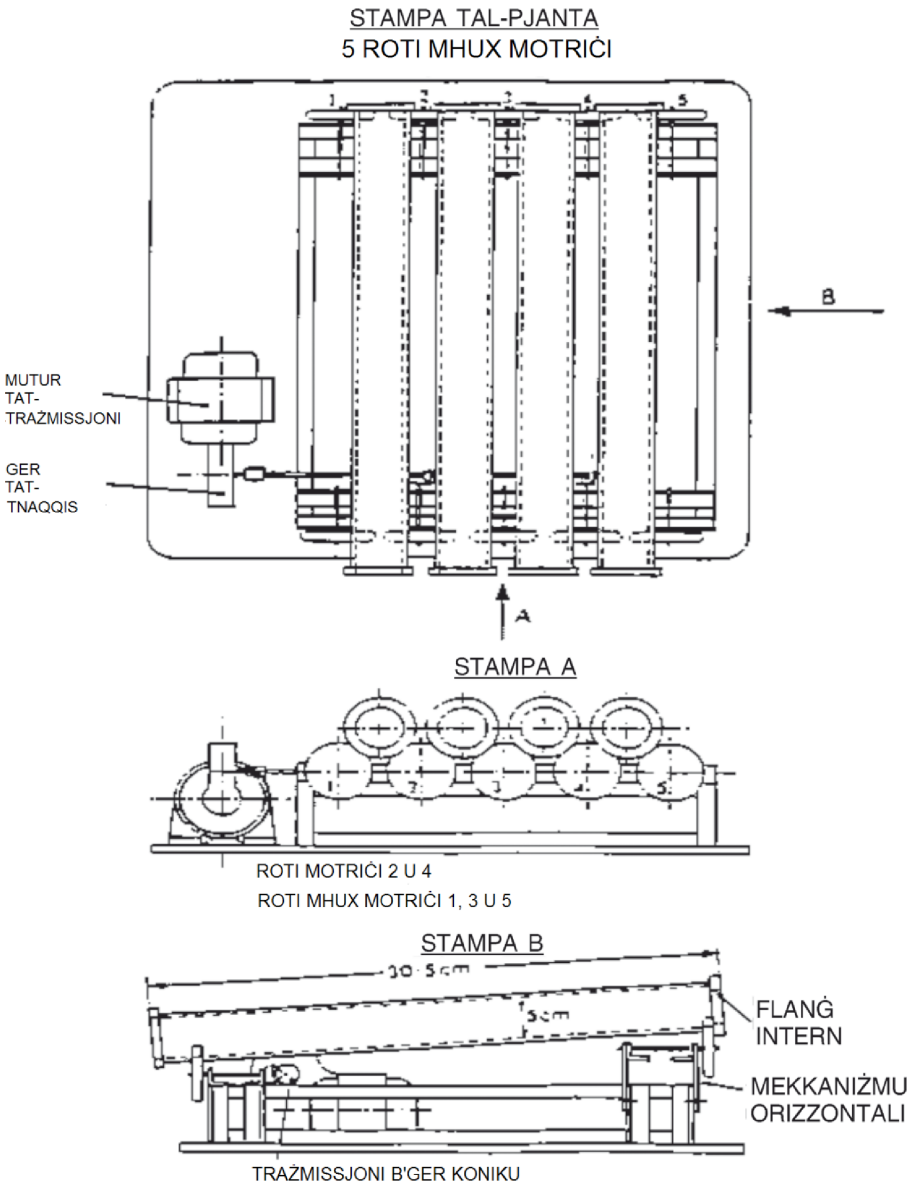
▼M4

Appendiċi 8

Figura 1

Tubi li jduru

▼C1



Glossarju:

Stampa tal-pjanta:

Stampa A/B:

Roti motriċi:

Roti mhux motriċi:

Mutur tat-trażmissjoni:

Ger tat-tnaqqis:

Flanġ intern:

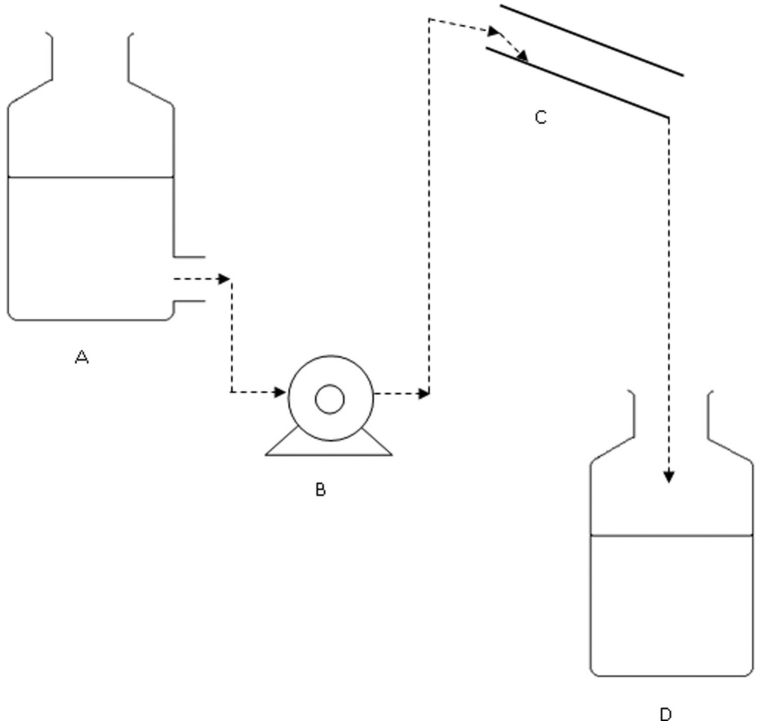
Mekkaniżmu orizzontali:

Trażmissjoni b'ger koniku:

▼**M4**

Figura 2

Dijagramma ta' fluss



A: Tank tal-Għalf

B: Pompa Peristaltika

C: Tubu li Jdur

D: Reċipjent għal Ġbir ta' Effluwenti

DEFINIZZJONIJIET:

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Kimiċi: "Għandu jkun innotat li l-fraži "kimika" tintuża ġeneralment fil-ftehimiet tal-UNCED u f'dokumenti li ġew wara biex tinkludi sustanza, prodotti, taħlitiet, tħejjijiet, jew kull fraži oħra li tista' tintuża f'sistemi eżistenti biex jindikaw "kopertura"."

▼M6

C.11. HAMA ATTIVATA, TEST TAL-INIBIZZJONI RESPIRATORJA (KARBONJU U OSSIDAZZJONI TAL-AMMONIJAKA)

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 209 tal-OECD (2010) Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi metodu biex jiddetermina l-effetti ta' sustanza kimika fuq il-mikro-organiżmi minn ħama attivata (fil-biċċa l-kbira batterji) billi titkejjel ir-rata ta' respirazzjoni tagħhom (karbonju u/jew ossidazzjoni tal-ammonju) f'kundizzjonijiet iddefiniti fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test. Il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq it-test ETAD (1) (2) (Assoċjazzjoni Ekoloġika u Tossikoloġika tal-industrija tal-Manifattura tas-Sustanżi taż-Żebgħa), fuq l-OECD TG 209 preċedenti (3) u fuq l-Istandard ISO rivedut 8192 (4). L-iskop tat-test huwa li jipprovdi metodu ta' skrinjar rapidu biex jivvaluta l-effetti tas-sustanzi kimiċi fuq il-mikro-organiżmi tal-ħama attivata tal-istadju (aerobiku) bijoloġiku tal-impjanti tat-trattament tal-ilma mormi. Ir-riżultati tat-test jistgħu jservu wkoll bħala indikatur ta' konċentrazzjonijiet mhux inibitorji xierqa tas-sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jintużaw fit-testijiet tal-bijodegradabilità (perżempju Kapitoli C.4 A-F, C.9, C.10, C12 u C.29 ta' dan l-Anness, OECD TG302C). F'dan il-każ, it-test jista' jitwettaq bħala test tal-iskrinjar, b'mod simili għas-sejba tal-medda jew it-test tal-limitu (ara l-paragrafu 39), li jikkunsidra r-respirazzjoni globali biss. Madankollu, din l-informazzjoni għandha titqies b'attenzjoni għal testijiet tal-bijodegradabbiltà lesti (Kapitolu C.4 A-F u C.29 ta' dan l-Anness) għal liema l-konċentrazzjoni tal-inokulu hija sinifikament inqas minn dik użata f'dan il-metodu ta' ttestjar. Fil-fatt, nuqqas ta' inibizzjoni f'dan it-test tar-respirazzjoni mhux bilfors jirriżulta f'kudizzjonijiet mhux inibitorji fit-test tal-bijodegradabilità faċli tal-Kapitoli C.4 A-F jew C.29 ta' dan l-Anness.

2. B'mod ġenerali, l-inibizzjoni tar-respirazzjoni tidher li ġiet applikata b'suċċess minn mindu ġiet applikata l-ewwel, iżda f'xi okkażjonijiet ġew irrapportati riżultati foloz, eż. (2) (4) (5). Kurvi ta' respirazzjoni relatati mal-konċentrazzjoni xi drabi jkunu maqsumin f'żewġ fażijiet, il-plotts ta' doża-rispons tgħawġu u l-valuri EC_{50} kienu baxxi b'mod mhux mistenni (5). L-investigazzjonijiet urew li tali riżultati jinkisbu meta l-ħama attivata użata fit-test tinnitrifika b'mod sinifikanti u s-sustanza kimika tat-test għandha effett ikbar fuq l-ossidazzjoni tal-ammonju milli fuq l-ossidazzjoni eterotrofika ġenerali. Għalhekk, dawn ir-riżultati foloz jistgħu jingħelbu billi jsir ittestjar addizzjonali permezz ta' inibitur speċifiku tan-nitrifikazzjoni. Bil-kejl tar-rati ta' teħid tal-ossiġenu fil-preżenza u n-nuqqas ta' tali inibitur, eż. N-alliltjourea (ATU), jistgħu jiġu kkalkolati r-rati ta' teħid tal-ossiġenu eterotrofiku u ta' nitrifikazzjoni separat totali (4) (7) (8). Għalhekk, l-effetti inibitorji ta' sustanza kimika tat-test fuq iż-żewġ proċessi jistgħu jiġu ddeterminati u l-valuri EC_{50} kemm għall-ossidazzjoni tal-karbonju organiku (eterotrofika) kif ukoll l-ossidazzjoni tal-ammonijaka (nitrifikazzjoni) jistgħu jiġu kkalkolati bħas-soltu. Ta' min jinnota li f'xi każijiet rari, l-effett inibitorju ta' N-alliltjourea jista' jitħassar parzjalment jew kompletament bħala riżultat tal-kumplessazzjoni mas-sustanzi kimiċi tat-test jew is-supplimenti tal-midjum, eż. joni Cu^{++} (6). Il-joni Cu^{++} huma essenzjali għal *Nitrosomonas*, iżda huma tossiċi f'konċentrazzjoni ogħla.

3. Il-ħtieġa għal nitrifikazzjoni fit-trattament ajrobiku tal-ilmijiet mormija, bħala pass meħtieġ fil-proċess ta' tneħħija tal-komposti tan-nitroġenu mill-ilmijiet mormija b'denitrifikazzjoni għall-prodotti gassużi, saret urġenti b'mod partikolari fil-pajjiżi Ewropej; l-UE issa stabbilixxiet limiti iktar baxxi għall-konċentrazzjoni ta' nitroġenu fl-effluwenti trattati skarikati fl-ilmijiet riċeventi. ([1]).

([1]) Id-Direttiva tal-Kunsill 91/271/KEE tal-21 ta' Mejju 1991 dwar it-trattament ta' l-ilma urban mormi. ĠU L 135, 30.5.1991, p. 40

▼M6

4. Għall-bidċa l-kbira tal-każijiet, il-metodu biex jiġi vvalutat l-effett fuq il-proċessi ta' ossidazzjoni tal-karbonju organiku waħdu huwa biżżejjed. Madankollu, f'xi każijiet tkun meħtieġa eżaminazzjoni tal-effett fuq in-nitrifikazzjoni waħedha, jew kemm fuq in-nitrifikazzjoni kif ukoll fuq l-ossidazzjoni tal-karbonju organiku b'mod separat, għall-interpretazzjoni tar-riżultati u l-fehim tal-effetti.

PRINCIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

5. Ir-rati ta' respirazzjoni tal-kampjuni ta' ħama attivata mogħtija drenaġġ sintetiku jitkejlu f'ċellola magħluqa li fiha elettrodu tal-ossiġenu wara ħin ta' kuntatt ta' 3 sigħat. B'kunsiderazzjoni tax-xenarju ta' espożizzjoni realistiku, jaf ikunu xierqa żminijiet ta' kuntatt itwal. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi degradata malajr, eż. b'mod abjotiku permezz ta' idrolisi, jew hija volatili u l-konċentrazzjoni ma tistax tinżamm b'mod adegwat, jista' jintuża perjodu ta' espożizzjoni addizzjonali iqsar ta' eż. 30 minuta. Is-sensittività ta' kull lott ta' ħama attivata għandha tiġi vverifikata b'sustanza kimika ta' referenza xierqa fil-jum tal-espożizzjoni. It-test ġeneralment jintuża biex jiddetermina l-EC_x (eż. EC_{50}) tas-sustanza kimika tat-test u/jew il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

6. L-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu minn mikro-organiżmi li jossidaw il-karbonju organiku tista' tkun espressa b'mod separat minn dik minn mikro-organiżmi li jossidaw l-ammonju permezz tal-kejl tar-rati ta' teħid ta' ossiġenu fin-nuqqas u l-preżenza ta' N-alliltjourea, inibitur speċifiku tal-ossidazzjoni tal-ammonju għan-nitrit mill-batterji nitrifikanti tal-ewwel stadju. F'dan il-każ, il-perċentwal ta' inibizzjoni tar-rata ta' teħid ta' ossiġenu huwa kkalkolat bi tqabbil tar-rata ta' teħid ta' ossiġenu fil-preżenza ta' sustanza kimika tat-test bir-rata ta' teħid tal-ossiġenu medja tal-kontrolli korrispondenti li ma fihom ebda sustanza kimika tat-test, kemm fil-preżenza kif ukoll fin-nuqqas tal-inibitur speċifiku, N-alliltjourea.

7. Kwalunkwe teħid ta' ossiġenu li jirriżulta minn proċessi abijotiċi jista' jiġi skopert billi tiġi ddeterminata r-rata fit-taħlitiet tas-sustanza kimika tat-test, il-midjum tad-drenaġġ sintetiku u l-ilma, filwaqt li titħalla barra l-ħama attivata.

INFORMAZZJONI TAS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

8. L-identifikazzjoni (idealment in-numru CAS), l-isem (IUPAC), il-purita, is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-volatilità u l-karatteristiċi tal-adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test għandhom ikunu magħrufa biex issir l-interpretazzjoni korretta tar-riżultati. Normalment, is-sustanzi kimiki volatili ma jistgħux jiġu ttestjati b'mod adegwat sakemm ma jittieħdux prekawzzjonijiet speċjali (ara l-paragrafu 21).

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

9. Il-metodu ta' ttestjar jista' jiġi applikat għal sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma, li ma tantx jinħallu u sustanzi kimiċi volatili. Madankollu, mhux dejjem jaf ikun possibbli li jinkisbu valuri EC_{50} b'sustanzi kimiċi ta' solubbiltà limitata u riżultati validi b'sustanzi kimiċi volatili jistgħu jinkisbu biss sakemm il-bidċa l-kbira (xi > 80 %) tas-sustanza kimika tat-test tibqa' fit-taħlita tar-reazzjoni fi tmiem il-perjodu/perjodi ta' espożizzjoni. Għandha tiġi sottomessa dejta ta' appoġġ analitika addizzjonali biex tiġi rfinata l-konċentrazzjoni EC_x meta jkun hemm xi inċertezza dwar l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test jew il-volatilità tagħha.

▼M6

SUSTANZI KIMIĊI TA' REFERENZA

10. Is-sustanzi kimiċi ta' referenza għandhom jiġu ttestjati perjodikament sabiex jiġi żgurat li l-metodu ta' ttestjar u l-kundizzjonijiet tat-test huma affidabbli, u biex tiġi ċċekkjata s-sensittività ta' kull lott ta' ħama attivata użata bħala inokulu mikrobjali dakinhar tal-espożizzjoni. Is-sustanza kimika 3,5-diklorofenol (3,5-DCP) hija rakkomandata bħala s-sustanza kimika inibitorja ta' referenza, peress li hija inibitur magħruf tar-respirazzjoni u tintuża f'diversi tipi ta' test għal inibizzjoni/tossiċità (4). Jista' jintuża wkoll sulfat tar-ram (II) pentaidrat bħala sustanza kimika ta' referenza għall-inibizzjoni tar-respirazzjoni totali (9). N-metilanilina tista' tintuża bħala inibitur ta' nitrifikazzjoni ta' referenza speċifiku (4).

KRITERJI TA' VALIDITÀ U RIPRODUĊIBBILTÀ

11. Ir-rata ta' teħid tal-ossiġenu b'kontrolli inbjank (mingħajr is-sustanza kimika tat-test jew is-sustanza kimika ta' referenza) ma għandhiex tkun inqas minn 20 mg ossiġenu għal kull gramma ħama attivata (piż xott ta' solidi sospiżi) f'siegħa. Jekk ir-rata hija inqas, it-test għandu jiġi ripetut b'ħama attivata maħsula jew mill-ħama minn sors ieħor. Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-rata ta' teħid tal-ossiġenu fir-repliki ta' kontroll ma għandux ikun iktar ta' 30 % fi tmiem it-test finali.

12. F'ring test internazzjonali tal-2004 organizzat mill-ISO (4) permezz ta' ħama attivata derivata minn drenaġġ domestiku, instab li l-EC_{50} ta' 3,5-DCP hija fil-medda ta' 2 mg/l sa 25 mg/l għar-respirazzjoni totali, 5 mg/l sa 40 mg/l għal respirazzjoni eterotropika u 0,1 mg/l sa 10 mg/l għal respirazzjoni ta' nitrifikazzjoni. Jekk l-EC_{50} ta' 3,5-DCP ma taqax fil-medda mistennija, it-test għandu jiġi ripetut b'ħama attivata minn sors ieħor. L-EC_{50} ta' sulfat tar-ram (II) pentaidrat għandha taqa' fil-medda ta' 53-155 mg/l għar-respirazzjoni totali (9).

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Reċipjenti u apparat tal-ittestjar

13. Għandu jintuża t-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dawn li ġejjin:

(a) Reċipjenti tat-test — pereżempju, bekkijiet ta' 1 000 ml biex ikun fihom 500 ml taħlita ta' reazzjoni (ara 5 f'Fig.1);

(b) Ċelloli u aċċessorji għall-kejl ta' konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt; elettrodu tal-ossiġenu xieraq; ċellola magħluqa biex tinkludi l-kampjun mingħajr ebda spazju vojt fuqani u reġistratur (eż. 7, 8, 9 f'Fig.1 tal-Appendiċi 2); inkella, jista' jintuża flixkun BOD bi sleeve adaptor xieraq għall-issiġillar tal-elettrodu tal-ossiġenu mal-għonq tal-flixkun (ara Fig. 2 tal-Appendiċi 3). Biex jiġi evitat it-telf ta' likwidu spostat mal-inserzjoni tal-elettrodu tal-ossiġenu, huwa rakkomandat li l-ewwel jiddaħħal lembut jew tubu tal-ħġieġ mis-sleeve, jew li jintużaw reċipjenti b'rimmijiet flared-out. Fiż-żewġ każijiet għandu jintuża ħawwad manjetiku jew metodu ta' tħawwid alternattiv, eż. sonda awtomatika ta' taħwid;

(c) Ħawwada manjetiċi u segwituri, mgħottijin b'materjali inerti, għall-użu f'kompartiment tal-kejl u/jew fir-reċipjenti tat-test;

(d) Apparat ta' arjazzjoni: jekk ikun meħtieġ, għandha tingħadda arja kumpressa permezz ta' filtru xieraq biex jitneħħa t-trab u ż-żejt u permezz ta' fliexken tal-ħasil li fihom l-ilma biex tiġi umidifikata

▼M6

l-arja. Il-kontenuti tar-reċipjenti għandhom jiġu arjati b'pipetti tal-Pasteur, jew apparat ta' arjazzjoni ieħor, li ma jassorbix sustanzi kimiċi. Ħawwad orbitali mħaddem f'veloċitajiet orbitanti bejn 150 u 250 rpm bi flasks pereżempju, b'kapaċità ta' 2 000 ml, jistgħu jintużaw biex jissodisfaw id-domanda ta' ossiġenu għall-ħama u jingħelbu d-diffikultajiet bis-sustanzi kimiċi li jipproduċu ragħwa eċċessiva, huma volatili u għalhekk jintilfu, jew huma diffiċli biex tferrixhom meta jiġu arjati bi sparging tal-arja. Is-sistema tat-test hija ġeneralment ta' bekkijiet arjati kontinwament u sekwenzjalment stabbiliti (eż. f'intervalli ta' madwar 10 — 15-il minuta), imbagħad analizzati b'mod sekwenzali. Tista' tintuża wkoll strumentazzjoni vvalidata li tippermetti l-arjazzjoni simultanja u l-kejl tar-rata ta' konsum tal-ossiġenu fit-taħlitiet;

(e) miter tal-pH;

(f) Iċċentrifuga, ċentrifuga ġenerali ta' fuq il-bank għal ħama b'kapaċità ta' 10 000 m/s^2.

Reaġenti

14. Għandhom jintużaw biss reaġenti bi grad analitiku l-ħin kollu.

Ilma

15. Għandu jintuża ilma distillat jew dejonizzat, li fih inqas minn 1 mg/l DOC, ħlief meta jkun speċifikat ilma tal-vit mingħajr klorin.

Għalf minn drenaġġ sintetiku

16. Il-midjum għandu jitħejja biex ikun fih il-kostitwenti li ġejjin fl-ammonti ddikjarati:

— pepton	16 g
— estratt tal-laħam (jew estratt tal-ħxejjex paragunabbli)	11 g
— urea	3 g
— klorur tas-sodju (NaCl)	0,7 g
— diidrat tal-klorur tal-kalċju ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— anhydrous potassium monohydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2,8g
— ilma distillat jew dejonizzat sa litru	

17. Il-pH ta' din is-soluzzjoni għandu jkun ta' 7,5 ± 0,5. Jekk il-midjum imħejji ma jintużax mill-ewwel, dan għandu jinħażen fid-dlam f'0 °C sa 4 °C, għal mhux iktar minn ġimgħa jew f'kundizzjonijiet, li ma jibdlux il-kompożizzjoni tiegħu. Ta' min jinnota li dan id-drenaġġ sintetiku huwa konċentrat ta' 100 darba ta' dak deskritt fir-Rapport Tekniku tal-OECD “Metodu propost għad-determinazzjoni tal-bijodegradabbiltà tas-surfetanti użati fid-deterġenti sintetiċi” 11 ta' Ġunju 1976, b'żieda ta' fosfat tal-idroġenu tad-dipotassju wkoll.

▼M6

18. Inkella, il-komponenti tal-midjum jistgħu jiġi sterilizzati individwalment qabel il-ħżin, jew il-pepton u l-estratt tal-laħam jistgħu jiżdiedu ftit qabel ma jsir it-test. Qabel l-użu, il-midjum għandu jitħallat sew u l-pH aġġustat jekk ikun meħtieġ għal pH 7,5 ± 0,5.

Sustanza kimika tat-test

19. Għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija għal sustanzi tat-test li jinħallu fl-ilma mill-ewwel sas-solubbiltà massima tal-ilma biss (preċipitazzjonijiet mhumiex aċċettabbli). Sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma, it-taħlitiet b'komponenti ta' solubbiltà fl-ilma differenti u s-sustanzi adsorbivi għandhom jiġu pponderati direttament fir-reċipjenti tat-test. F'dawn il-każijiet, l-użu ta' soluzzjonijiet ewlenin jaf ikun alternattiva jekk il-konċentrazzjonijiet maħlula tas-sustanzi kimiċi tat-test huma analitikament determinati fir-reċipjenti tat-test (qabel tiżdied ħama attivata). Jekk jiġu ppreparati frazzjonijiet akkomodati bl-ilma (WAFs), hija essenzjali wkoll determinazzjoni analitika tal-konċentrazzjonijiet maħlula tas-sustanzi kimiċi tat-test fir-reċipjenti tat-test. Għandu jiġi evitat l-użu ta' solventi organiċi, aġenti dispersivi/emulsifikanti biex tittejjeb is-solubbiltà. Ultrasonikazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u sospensjonijiet ta' qabel it-taħlit, eż. ta' matul il-lejl, huwa possibbli meta jkun hemm informazzjoni adegwata disponibbli dwar l-istabbilità tas-sustanza kimika tat-test f'tali kundizzjonijiet.

20. Is-sustanza kimika tat-test tista' taffettwa ħażin il-pH fi ħdan is-sistema tal-ittestjar. Il-pH tat-taħlitiet ittrattati bis-sustanza kimika tat-test għandu jiġi ddeterminat qabel il-konfigurazzjoni tat-test, fi prova preliminari, biex jiġi aċċertat jekk ikunx meħtieġ aġġustament tal-pH qabel it-test ewlieni u anki dakinhar tat-test ewlieni. Soluzzjonijiet/sospensjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma għandhom jiġu newtralizzati qabel iż-żieda tal-inokulu, jekk ikun meħtieġ. Madankollu, peress li n-newtralizzazzjoni tista' tibdel il-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika, jista' jsir iktar ittestjar, skont il-finijiet tal-istudju, biex jiġi vvalutat l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq il-ħama mingħajr l-aġġustament tal-pH.

21. L-effetti tossiċi tas-sustanzi kimiċi volatili, speċjalment fit-testijiet li fihom l-arja tgħaddi effervexxentement mis-sistema, jistgħu jirriżultaw f'livelli ta' effett varjabbli minħabba t-telf tas-sustanza matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Għandha tiġi eżerċitata kawtela b'tali sustanzi billi ssir analiżi speċifika għas-sustanza tat-taħlitiet ta' kontroll li fihom is-sustanza u jiġi mmodifikat ir-reġim ta' arjazzjoni.

Sustanza kimika ta' referenza

22. Jekk 3,5-diklorofenol jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza, għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ta' 1,00 g ta' 3,5-diklorofenol f'1 000 ml ilma (15). Għandu jintuża ilma sħun u/jew ultrasonifikazzjoni biex jiġi aċċellerat ix-xoljiment u biex is-soluzzjoni tilħaq il-volum meta titkessaħ għat-temperatura tal-kamra. Madankollu, għandu jiġi żgurat li s-sustanza kimika ta' referenza ma tinbidilx strutturalment. Il-pH tas-soluzzjoni għandu jiġi ċċekkjat u aġġustat, jekk ikun meħtieġ, b'NaOH jew H_2SO_4 sa pH 7 — 8.

23. Jekk jintuża sulfat tar-ram(II)pentaidrat bħala sustanza kimika ta' referenza, jintużaw konċentrazzjonijiet ta' 58 mg/l, 100 mg/l u 180 mg/l (fattur ta' 1,8). Is-sustanza tiġi ponderata dirrettament fir-reċipjenti tat-test (29 — 50 — 90 mg għal volum totali ta' 500 ml). Imbagħad tinħall b'234 ml ta' ilma tal-vit awtoklavat. Is-sulfat tar-ram(II)pentaidrat jinħall faċilment. Meta jinbeda t-test, jiżdiedu 16-il ml drenaġġ sintetiku u 250 ml ħama miżjuda.

▼M6

Inibitur speċifiku tan-nitrifikazzjoni

24. Għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija ta' 2,32 g/l N-alliltjourea (ATU). Iż-żieda ta' 2,5 ml ta' din is-soluzzjoni ewlenija ma' taħlita ta' inkubazzjoni ta' volum finali ta' riżultati ta' 500 ml f'konċentrazzjoni finali ta' 11,6 mg ATU/l (10^{-4}mol/l) li hija magħrufa bħala suffiċjenti (4) biex tikkawża inibizzjoni ta' 100 % f'ħama attivata nitrifikanti li fiha 1,5 g/l solidi sospiżi.

Kontroll abjotiku

25. F'ċerti kundizzjonijiet rari, sustanza kimika tat-test bi proprjetajiet riduċenti qawwija jistgħu jikkawżaw konsum ta' ossiġenu abjotiku li jista' jitkejjel. F'tali każijiet, huma meħtieġa kontrolli abjotiċi biex issir diskriminazzjoni bejn it-teħid ta' ossiġenu abjotiku mis-sustanza kimika tat-test u r-respirazzjoni mikrobjali. Jistgħu jiġu ppreparati kontrolli abjotiċi billi l-inokulu jitħalla barra mit-taħlitiet tat-test. B'mod simili, kontrolli abjotiċi mingħajr inokulu jistgħu jiġu inklużi meta jitwettqu miżuri analitiċi biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni milħuqa matul il-fażi ta' espożizzjoni tal-ittestjar, eż. meta jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta' sustanzi kimiċi li ma tantx jinħallu fl-ilma b'komponenti b'solubbiltà fl-ilma differenti. F'każijiet speċifiċi, jaf ikun meħtieġ li jitħejja kontroll abjotiku b'inokulu sterilizzat (eż. bl-awtoklavazzjoni jew iż-żieda ta' tossikanti sterilizzati). Xi sustanzi kimiċi jafu jipproduċu jew jikkunsmaw ossiġenu biss jekk l-erja tal-wiċċ hija kbira biżżejjed għal reazzjoni, anki jekk normalment iridu temperatura jew pressjoni ferm ogħla biex jagħmlu hekk. F'dan ir-rigward, għandha tingħata attenzjoni speċjali lis-sustanzi perossidiċi. Inokulu sterilizzat jipprovdi erja tal-wiċċ kbira.

Inokulu

26. Għal użu ġenerali, għandha tinġabar ħama attivata mill-ħruġ tat-tank ta' arjazzjoni, jew qrib il-ħruġ mit-tank, ta' impjant ta' trattament tal-ilma mormi operat sew li jirċievi fil-biċċa l-kbira drenaġġ domestiku. Skont il-fini tat-test, tipi jew sorsi oħra adegwata ta' ħama attivata, eż. ħama mkabbra fil-laboratorju, tista' tintuża f'konċentrazzjonijiet ta' solidi sospiżi xierqa ta' 2 g/l sa 4 g/l. Madankollu, il-ħama minn impjanti ta' trattament differenti x'aktarx li tesebixxi karatteristiċi u sensittivitajiet differenti.

27. Il-ħama tista' tintuża kif miġbura iżda l-frak oħxon għandu jitneħħa billi jitħalla joqgħod għal perjodu qasir, eż. 5 sa 15-il minuta, u bid-dekantazzjoni tas-saff ta' fuq ta' solidi rqaq jew billi jingħadda minn passatur (eż. malja ta' 1 mm^2). Inkella, il-ħama tista' tiġi omoġenizzata f'mikser għal madwar 15-il sekonda jew iktar, iżda hija meħtieġa kawtela fir-rigward tal-forzi laterali u l-bidla fit-temperatura li tista' sseħħ għal perjodi twal ta' taħlit.

28. Ħafna drabi huwa meħtieġ il-ħasil tal-ħamrija, eż. jekk ir-rata ta' respirazzjoni endoġena tkun baxxa. Il-ħama għandha l-ewwel tiġi ċentrifugata għal perjodu biex jiġi prodott supernatant u gerbub ta' solidi tad-drenaġġ, eż. 10 minuti f'madwar 10 000 m/s^2. Il-likwidu supernatanti għandu jintrema' u l-ħama għandha tiġi sospiża mill-ġdid f'ilma tal-vit mingħajr kloru, billi titħawwad, u l-ilma tal-ħasil imbagħad għandu jitneħħa b'ċentrifugazzjoni mill-ġdid u billi jerġa' jitneħħa. Il-proċess tal-ħasil u ċ-ċentrifugazzjoni għandu jiġi ripetut, jekk ikun meħtieġ. Il-massa xotta ta' volum magħruf ta' ħama sospiża mill-ġdid għandha tiġi ddeterminata u l-ħama tiġi konċentrata billi jitneħħa l-likur jew tiġi dilwita iktar f'ilma tal-vit mingħajr

▼M6

kloru biex jinkisbu l-konċentrazzjonijiet ta' solidi tal-ħama meħtieġa ta' 3 g/l. Il-ħama attivata għandha tiġi arjata kontinwament (eż. 2 l/minuta) fit-temperatura tal-ittestjar u, fejn ikun possibbli tintuża fil-jum tal-ġbir. Jekk dan ma jkunx possibbli, il-ħama kuljum għandha tingħata drenaġġ sintetiku (50 ml ħama attivata mdaħħla/l ta' drenaġġ sintetiku) għal jumejn oħra. Imbagħad il-ħama tintuża għat-test u r-riżultati jiġu aċċettati bħala validi, sakemm ma tkun seħħet ebda bidla sinifikanti fl-attività tagħha, ivvalutata mir-rata ta' respirazzjoni eterotropika u ta' nitrifikazzjoni endoġena.

29. Jistgħu jinqalgħu diffikultajiet jekk ikun hemm ragħwa matul l-inkubazzjoni sal-punt li r-ragħwa u s-solidi tal-ħama li jinġarru magħha, jinħarġu mir-reċipjenti tal-arjazzjoni. Xi drabi, ir-ragħwa tista' sempliċement tirriżulta mill-preżenta tad-drenaġġ sintetiku, iżda wieħed għandu jantiċipa l-formazzjoni rar-ragħwa jekk is-sustanza kimika tat-test hija, jew fiha, aġent tensjoattiv. Telf ta' solidi tal-ħama mit-taħlitiet tal-ittestjar sejjer jirriżulta f'rati ta' respirazzjoni artifiċjalment inqas li bi żball jistgħu jiġu interpretati bħala riżultat tal-inibizzjoni. Barra minn hekk, l-arjazzjoni ta' soluzzjoni ta' aġent tensjoattiv tikkonċentra l-aġent tensjoattiv fis-saff tar-ragħwa; telf tar-ragħwa mis-sistema tal-ittestjar sejjer ibaxxi l-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni. Ir-ragħwa tista' sempliċement tiġi kkontrollata b'metodi mekkaniċi sempliċi (eż. billi xi drabi titħawwad manwalment permezz ta' virga tal-ħġieġ) jew biż-żieda ta' aġent kontra r-ragħwa b'emulsjoni tas-siliċju mingħajr aġenti tensjoattivi u/jew bl-użu tal-metodu ta' arjazzjoni tat-tħawwid tal-flask. Jekk il-problema hija assoċjata mal-preżenza tad-drenaġġ sintetiku, il-kompożizzjoni tad-drenaġġ għandha tiġi mmodifikata billi jiġi inkluż reaġent kontra r-ragħwa b'rata ta' eż. 50 µl/l. Jekk ir-ragħwa hija kkawżata mis-sustanza kimika tat-test, il-kwantità meħtieġa għat-tnaqqis għandha tiġi ddeterminata fil-konċentrazzjoni tat-test massima, u mbagħad ir-reċipjenti ta' arjazzjoni individwali kollha għandhom jiġu ttrattati bl-istess mod (inkluż dawk, eż. kontrolli inbjanki u r-reċipjenti ta' referenza fejn ma jkunx hemm ragħwa). Jekk jintużaw aġenti kontra r-ragħwa, ma għandu jkun hemm ebda interazzjoni mal-inokulu u/jew is-sustanza kimika tat-test.

PROĊEDURA TAT-TEST

30. L-inibizzjoni ta' tliet drabi differenti ta' teħid ta' ossiġenu tista' tkun determinata, totali, eterotropatika biss u dan minħabba n-nitrifikazzjoni. Normalment, il-kejl tal-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu totali għandu jkun adegwat. L-effetti fuq it-teħid tal-ossiġenu eterotropatiku mill-ossidazzjoni tal-karbonju organiku, u minħabba l-ossidazzjoni tal-ammonijaka huma meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit speċifiku għal tali żewġ punti ta' tmiem separati għal sustanza kimika partikolari jew (b'mod fakultattiv) biex jiġu spjegati kurvi ta' doża-rispons atipiċi mill-inibizzjoni tat-teħid totali tal-ossiġenu.

Kundizzjonijiet tat-test

31. It-test għandu jitwettaq f'temperatura fi ħdan il-medda ta' 20 ± 2 °C.

Taħlitiet tat-test

32. Għandhom jiġu ppreparati t-taħtliet tal-ittestjar (F_T bħal fit-Tabella 1) li fihom l-ilma, għalf tad-drenaġġ sintetiku u s-sustanza kimika tat-test biex jinkisbu konċentrazzjonijiet nominali differenti tas-sustanza kimika tat-test (Ara t-Tabella 1 għal eżempji tal-volumi tal-kostitwenti). Il-pH għandu jiġi aġġustat għal 7,5 ± 0,5, jekk ikun meħtieġ, it-taħlitiet għandhom jitħalltu bl-ilma u l-inokulu miżjud biex jinkisbu volumi finali ugwali fir-reċipjenti u biex tinbeda l-arjazzjoni.

Taħlitiet ta' referenza

33. It-taħlitiet (F_R) għandhom jiġu ppreparati bis-sustanza kimika ta' referenza, eż. 3,5-diklorofenol, minflok is-sustanza kimika tat-test bl-istess mod bħat-taħlitiet tal-ittestjar.

▼M6

Kontrolli inbjank

34. Fil-bidu (F_B) u fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni fit-testijiet li fihom il-bekkijiet jiġu kkonfigurati sekwenzjalment f'intervalli għandhom jiġu ppreparati kontrolli inbjanki (FB). Fit-testijiet imwettqa permezz ta' tagħmir li jippermetti li jsiru kejliet simultanji tal-konsum tal-ossiġenu, għandhom tal-inqas jiġu inklużi żewġ kontrolli inbjanki f'kull lott ta' analiżi simultanja. Il-kontrolli inbjank li fihom volum ugwali ta' ħama attivata u midjum sintetiku iżda mhux sustanza kimika tat-test jew ta' referenza. Dawn għandhom jitħalltu mal-ilma sal-istess volum bħat-taħlitiet tat-test u ta' referenza.

Kontroll abjotiku

35. Jekk ikun meħtieġ, pereżempju jekk sustanza kimika tat-test hija magħrufa jew suspettata li għandha proprjetajiet riduċenti qawwija, għandha tiġi ppreparata taħlita F_A biex jitkejjel il-konsum tal-ossiġenu abjotiku. It-taħlita għandu jkollha l-istess ammonti ta' sustanza kimika tat-test, għalf tad-drenaġġ sintetiku u l-istess volum bħat-taħlitiet tat-test, iżda ebda ħama attivata.

Proċedura u kejliet ġenerali

36. It-taħlitiet tat-test, it-taħlitiet ta' referenza u l-kontrolli inbjank u abijotiċi huma inkubati fit-temperatura tal-ittestjar f'kundizzjonijiet ta' arjazzjoni sfurzata (0,5 sa 1 l/min) biex il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlul tinżamm 'il fuq minn 60 % — 70 % saturazzjoni u biex il-frak tal-ħama jinżamm f'sospensjoni. Huwa meħtieġ ukoll li l-kulturi jitħawdu biex il-frak tal-ħama jinżamm f'sospensjoni. L-inkubazzjoni hija kkunsidrata mibdija mal-kuntatt inizjali tal-inokulu tal-ħama attivata ma' kosistwenti oħra tat-taħlita finali. Fi tmiem l-inkubazzjoni, wara l-ħinijiet ta' espożizzjoni speċifikati li s-soltu jkunu ta' 3 sigħat, il-kampjuni jiġu rtirati biex titkejjel ir-rata ta' tnaqqis tal-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt fiċ-ċellola ddisinjata għal dan il-għan (Fig.2 tal-Appendiċi 3) jew fi flixkun BOD mimli kollu. Il-mod li bih jinbdew l-inkubazzjonijiet jiddependi fuq il-kapaċità tat-tagħmir użat biex ikejjel ir-rati ta' konsum tal-ossiġenu. Pereżempju, jekk jinkludi sonda tal-ossiġenu waħda, il-kejliet isiru b'mod individwali. F'dan il-każ, id-diversi taħlitiet meħtieġa għat-test fid-drenaġġ sintetiku għandhom jiġu ppreparati iżda l-inokulu għandu jinżamm, u l-porzjonijiet meħtieġa ta' ħama għandhom jiżdiedu ma' kull reċipjent tas-serje. Kull inkubazzjoni għandha tinbeda sussegwentement, f'intervalli konvenjentement puntwali ta' eż. 10 sa 15-il minuta. Inkella, is-sistema ta' kejl tista' tinkludi diversi sondi li jiffaċilitaw kejliet multiplu simultanji; f'dan il-każ, l-inokulu jista' jiżdied fl-istess ħin ma' gruppi ta' reċipjenti xierqa.

37. Il-konċentrazzjoni tal-ħama attivata fit-taħlitiet tal-ittestjar, ta' referenza u inbjank kollha (iżda mhux ta' kontroll abijotiku) hija nominalment 1,5 g/l ta' solidi suspiżi. Il-konsum ta' ossiġenu għandu jitkejjel wara 3 sigħat ta' espożizzjoni. Għandhom isiru kejliet addizzjonali tal-espożizzjoni ta' 30 minuta kif xieraq u kif deskritt preċedentement fil-paragrafu 5.

Potenzjal ta' nitrifikazzjoni tal-ħama

38. Sabiex jiġi deċiż jekk il-ħama tinitrifikax u, jekk iva, b'liema rata, għandhom jiġu ppreparati taħlitiet (F_B) bħal fit-taħlitiet ta' kontroll inbjank u ta' "kontroll" addizzjonali (F_N) li iżda fihom ukoll N-alliltjourea f'11,6 mg/l.

▼M6

It-taħlitiet għandhom jiġu arjati u inkubati f'20° ± 2 °C għal 3 sigħat. Imbagħad għandhom jitkejlu r-rata ta' teħid tal-ossiġenu u għandha tiġi kkalkolata r-rata ta' teħid tal-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni.

Disinji tat-test

Test tas-sejba tal-medda

39. Meta jkun meħtieġ jintuża test preliminari, biex tiġi stmata l-medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test meħtieġa f'test finali għaddeterminazzjoni tal-inibizzjoni tal-konsum tal-ossiġenu. Inkella, in-nuqqas ta' inibizzjoni tal-konsum tal-ossiġenu mis-sustanza kimika tat-test f'test preliminarji jista' juri li test finali mhuwiex meħtieġ, iżda għandhom jiġu inklużi triplikati fl-ogħla konċentrazzjoni ttestjata tat-test preliminari (ġeneralment 1 000 mg/l, iżda li jiddependu fuq ir-rekwiżit tad-dejta).

Tabella 1

Eżempji ta' taħlitiet għat-test preliminari

Reaġent	Konċentrazzjoni Oriġinali				
Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test	10 g/l				
Soluzzjoni ewlenija tal-midjum sintetiku	Ara l-paragrafu 16				
Sospensjoni ewlenija tal-ħama attivata	3 g/l solidi suspiżi				
Komponenti tat-taħlita	Dożaġġ f'reċipjenti tat-test [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (ml) (paragrafi 19 sa 21)	0,5	5	50	0	50
Soluzzjoni ewlenija tal-għalf ta' drenaġġ sintetiku (ml) (paragrafu 16)	16	16	16	16	16
Sospensjoni ta' ħama attivata (ml) (paragrafi 26 sa 29)	250	250	250	250	250
Ilma (paragrafu 15)	233,5	229	184	234	434
Volum totali tat-taħlitiet (ml)	500	500	500	500	500
Konċentrazzjonijiet fit-taħlita					
Sospensjoni tal-ittestjar (mg/l) Ħama attivata	10	100	1 000	0	1 000
(solidi sospiżi) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] L-istess proċedura għandha tiġi segwita għas-sustanza kimika ta' referenza, biex jiġu kkalkolati flasks F_{R1-3}

40. It-test għandu jitwettaq tal-inqas permezz ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, pereżempju, 10 mg/l, 100 mg/l u 1 000 mg/l b'kontroll inbjank u, jekk ikun hemm bżonn, tal-inqas tliet kontrolli abjotiċi bl-ogħla konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test (ara bħala eżempju

▼M6

t-Tabella 1). Idealment l-inqas konċentrazzjoni ma għandu jkollha l-ebda effett fuq il-konsum tal-ossiġenu. Għandhom jiġu kkalkolati r-rati ta' teħid ta' ossiġenu u r-rata ta' nitrifikazzjoni, jekk ikunu rilevanti; imbagħad għandu jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' inibizzjoni. Skont l-iskop tat-test, huwa possibbli wkoll li sempliċement tiġi ddeterminata t-tossiċità ta' konċentrazzjoni limitu, pereżempju 1 000 mg/l. Jekk ma jseħħ ebda effett tossiku statistikament sinifikanti f'din il-konċentrazzjoni, mhuwiex meħtieġ ittestjar ulterjuri f'konċentrazzjonijiet ogħla jew inqas. Għandu jiġi nnotat li sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma, taħlitiet b'komponenti ta' solubbiltà fl-ilma differenti u s-sustanzi adsorbivi għandhom jiġu ponderati direttament fir-reċipjenti tat-test. F'dan il-każ, il-volum riservat għas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza tat-test għandu jiġi sostitwit b'ilma tat-taħlit.

Test finali

Inibizzjoni tat-teħid totali tal-ossiġenu

41. It-test għandu jitwettaq permezz ta' medda ta' konċentrazzjoni mnaqqsa mit-test preliminari. Sabiex jinkisbu kemm l-NOEC kif ukoll l-EC_x (eż. l-EC_{50}), fil-biċċa l-kbira tad-drabi huma rakkomandati sitt kontrolli u ħames konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika b'ħames repliki. Il-kontroll abjotiku ma għandux bżonn jiġi ripetut jekk ma kien hemm ebda teħid tal-ossiġenu fit-test preliminari, iżda jekk iseħħ teħid sinifikanti, għandhom jiġu inklużi kontrolli abijotiċi għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Is-sensittività tal-ħama għandha tiġi vverifikata permezz tas-sustanza kimika ta' referenza 3,5-diklorofenol. Is-sensittività tal-ħama għandha tiġi vverifikata għal kull serje ta' testijiet, peress li s-sensittività hija magħrufa li tvarja. Fil-każijiet kollha, il-kampjuni huma rtirati mir-reċipjenti tat-test wara 3 sigħat, u 30 minuta addizzjonali jekk ikun meħtieġ, għall-kejl tar-rata ta' teħid tal-ossiġenu fiċ-ċellola tal-elettrodi tal-ossiġenu. Mid-dejta miġbura, jiġu kkalkolati r-rati ta' respirazzjoni speċifiċi tat-taħlitiet ta' kontroll u tal-ittestjar; imbagħad il-perċentwal tal-inibizzjoni jiġi kkalkolat mill-ekwazzjoni 7, hawn taħt.

Distinzjoni bejn inibizzjoni ta' respirazzjoni eterotropika u nitrifikazzjoni

42. L-użu ta' inibitur ta' nitrifikazzjoni speċifiku, ATU, jippermetti l-valutazzjoni diretta tal-effetti inibitorji tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq l-ossidazzjoni eterotropika, u billi titnaqqas ir-rata ta' teħid tal-ossiġenu fil-preżenza tal-ATU mir-rata ta' teħid totali (l-ebda ATU preżenti), jistgħu jiġu kkalkolati l-effetti fuq ir-rata ta' nitrifikazzjoni. Għandhom jiġu ppreparati żewġ settijiet ta' taħlitiet ta' reazzjoni skont id-disinji tal-ittestjar għall-EC_x jew l-NOEC deskritti fil-paragrafu 41, iżda barra minn hekk, l-ATU għandu jiżdied ma' kull taħlita ta' sett wieħed fil-konċentrazzjoni finali ta' 11,6 mg/l, li ntweriet li tinibixxi kompletament in-nitrifikazzjoni fil-ħama b'konċentrazzjonijiet ta' solidi sospiżi sa 3 000 mg/l (4). Ir-rati ta' teħid ta' ossiġenu għandhom jitkejlu wara l-perjodu ta' espożizzjoni; dawn il-valuri diretti jirrappreżentaw ir-respirazzjoni eterotropika biss, u d-differenzi bejn dawn ir-rati ta' respirazzjoni u dawk totali korrispondenti jirrappreżentaw in-nitrifikazzjoni. Imbagħad jiġu kkalkolati d-diversi gradi ta' inibizzjoni.

Kejl

43. Wara l-perjodu/perjodi ta' espożizzjoni, għandu jiġi ttrasferit kampjun millewwel reċipjent ta' arjazzjoni lejn iċ-ċellola tal-elettrodi tal-ossiġenu (Fig. 1 tal-Appendiċi 2) u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlula għandha titkejjel minnufih. Jekk tkun disponibbli sistema tal-elettrodi multipla, allura l-kejliet jistgħu jsiru b'mod simultanju. It-taħwid (permezz ta' kalamita mgħottija) huwa essenzjali fl-istess rata bħal meta l-elettrodu jiġi kkalibrat biex jiżgura li s-sonda tirrispondi b'dewmien minimu għall-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu li jinbidlu, u biex ikun jista' jitkejjel l-ossiġenu regolari u riproduċibbli

▼M6

fir-reċipjent tal-kejl. Ġeneralment, is-sistema tas-sonda li titħawwad awtomatikament ta' xi elettrodi tal-ossiġenu hija adegwata. Iċ-ċellola għandha titlaħlaħ bl-ilma bejn kull kejl. Inkella, il-kampjun jista' jintuża biex jimla flixkun BOD (Fig. 2 tal-Appendiċi 3) mgħammar b'ħawwad manjetiku. Imbagħad għandha tiddaħħal sonda tal-ossiġenu bi sleeve adaptor fl-għonq tal-flixkun u l-ħawwad manjetiku għandu jiġi attivat. Fiż-żewġ każijiet, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għandha titkejjel b'mod kontinwu u rreġistrata għal perjodu, ġeneralment 5 sa 10 minuti jew sakemm il-konċentrazzjoni taqa' taħt iż-2 mg/l. L-elettrodu għandu jitneħħa, it-taħlita terġa' titpoġġa fir-reċipjent tal-arjazzjoni u għandhom jitkomplew l-arjazzjoni u t-taħwid, jekk ikun meħtieġ kejl wara perjodi ta' espożizzjoni twal.

Verifika tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

44. Għal xi finijiet, jaf ikun meħtieġ li titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Wieħed għandu jinnota li jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta':

— sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma,

— taħlitiet b'komponenti b'solubbiltà fl-ilma differenti, jew

— sustanzi b'solubbiltà fl-ilma tajba, iżda fejn il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija tqarreb is-solubbiltà fl-ilma massima,

jintuża, il-parti maħlula hija magħrufa, u l-konċentrazzjoni reali tas-sustanza kimika tat-test li hija ttrasferita fir-reċipjenti tat-test mhijiex magħrufa. Sabiex tiġi kkaratterizzata l-espożizzjoni, hija meħtieġa stima analitika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Biex jiġu simplifikati l-kwistjonijiet, għandha ssir stima analitika qabel iż-żieda tal-inokulu. Minħabba l-fatt li l-frazzjonijiet maħlula biss sejrin jiġu ttrasferiti fir-reċipjenti tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejla jistgħu jkunu baxxi ħafna.

45. Sabiex tiġi evitata analitika li tieħu l-ħin u li tiswa ħafna flus, huwa rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tiġi sempliċement ppeżata fir-reċipjenti tat-test u li ssir referenza għall-konċentrazzjoni nominali ponderata inizjali għal kalkoli sussegwenti. Mhijiex meħtieġa distinzjoni bejn frazzjonijiet maħlula, mhux maħlula jew adsorbiti tas-sustanza kimika tat-test peress li dawn il-frazzjonijiet kollha jidhru f'kundizzjonijiet reali f'impjant ta' trattament tal-ilma mormi bl-istess mod, u dawn il-frazzjonijiet jista' jvarjaw skont il-kompożizzjoni tad-drenaġġ. L-għan tal-metodu ta' ttestjar huwa li jagħti stima realistika tal-konċentrazzjoni inibitorja u mhuwiex xieraq biex jinvestiga fid-dettall liema frazzjonijiet jagħmlu kontribuzzjoni għall-inibizzjoni tal-organiżmi tal-ħama attivata. Fl-aħħar nett, is-sustanzi adsorbivi għandhom jintiżnu direttament ukoll fir-reċipjenti tat-test; u r-reċipjenti għandhom jiġu silanizzati biex jitnaqqas it-telf permezz ta' adsorbiment.

DEJTA U RAPPORTAR

Kalkolu tar-rati ta' teħid tal-ossiġenu

46. Ir-rati ta' teħid tal-ossiġenu għandhom jiġu kkalkolati mill-medja tal-valuri mkejla, perżempju minn parti lineari tal-graffs tal-konċentrazzjoni tal-ossiġenu meta mqabbel mal-ħin, billi jiġu limitati l-kalkoli tal-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu bejn 2,0 mg/l u 7,0 mg/l, peress li konċentrazzjonijiet ogħla u inqas jistgħu huma stess jinfluwenzaw ir-rati ta' konsum. Devjazzjoni minn dawn il-faxex ta' konċentrazzjoni taħt jew 'il fuq minn dawn il-valuri

▼**M6**

hija xi drabi inevitabbli u meħtieġa, pereżempju, meta r-respirazzjoni tkun imrażżna ħafna u konsegwentement bil-mod ħafna, jew jekk xi ħama attivata partikolari jkollha respirazzjoni mgħaġġla ħafna. Dan huwa aċċettabbli sakemm is-sezzjonijiet estiżi tal-graff tat-teħid huma dritti u l-gradjenti tagħhom ma jinbidlux peress li jgħaddu mil-limiti ta' 2,0 mg/l jew 7,0 mg/l O_2. Kwalunkwe sezzjoni mgħawġa tal-graff tindika li s-sistema ta' kejl qiegħda tistabbilizza jew ir-rata ta' teħid qiegħda tinbidel u ma għandhiex tintuża għall-kalkolu tar-rati ta' respirazzjoni. Ir-rata ta' teħid tal-ossiġenu għandha tiġi espressa f'milligrammi għal kull litru fis-siegħa (mg/lh) jew milligrammi għall kull gramma ħama xotta fis-siegħa (mg/gh). Ir-rata ta' konsum tal-ossiġenu, R, f'mg/lh, tista' tiġi kkalkolata jew interpolata mill-parti lineari tal-graff ta' tnaqqis tal-ossiġenu rreġistrata skont l-Ekwazzjoni 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

fejn:

Q_1 hija l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu fil-bidu tas-sezzjoni magħżula tal-faži lineari (mg/l);

Q_2 hija l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu fi tmiem is-sezzjoni magħżula tal-faži lineari (mg/l);

Δ_t huwa l-intervall ta' ħin bejn dawn iż-żewġ kejliet (min.).

47. Ir-rata ta' respirazzjoni speċifika (R_s) hija espressa bħala l-ammont ta' ossiġenu kkunsmat għal kull gramma ta' piż xott ta' ħama fis-siegħa (mg/gh) skont l-Ekwazzjoni 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

fejn SS hija l-konċentrazzjoni tas-solidi suspiżi fit-taħlita tal-ittestjar (g/l).

48. L-indiċijiet differenti ta' R li jistgħu jingħaqdu flimkien huma:

S rata speċifika

T rata ta' respirazzjoni totali

N rata minħabba respirazzjoni tan-nitrifikazzjoni

H rata minħabba respirazzjoni eterotropika

A rata minħabba l-proċessi abijotiċi

B rata bbażata fuq l-assaġġi inbjank (medja)

Kalkolu tar-rata ta' teħid tal-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni

49. Ir-relazzjoni bejn ir-respirazzjoni totali (R_T), ir-respirazzjoni tan-nitrifikazzjoni (R_N) u r-respirazzjoni eterotropika (R_H) tiġi kkalkolata bl-Ekwazzjoni 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

fejn:

R_N hija r-rata ta' teħid tal-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni (mg/lh);

R_T hija r-rata mkejla tar-rata tal-ossiġenu mill-kontroll inbjank (l-ebda ATU; F_B) (mg/lh).

R_H hija r-rata mkejla tar-rata tal-ossiġenu tal-kontroll inbjank b'ATU miżjud (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Din ir-relazzjoni hija valida għal valuri vojta (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), kontrolli abjotiċi (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) u assaġġi b'kimiċi ta' prova (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Rati ta' respirazzjoni speċifiċi huma kkalkolati minn:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Jekk R_N hija insinifikanti (eż. < 5 % ta' R_T f'kontrolli inbjanki) f'test preliminari, wieħed jista' jassumi li t-teħid tal-ossiġenu eterotrofiku huwa ugwali għat-teħid totali u li mhi qiegħda sseħħ ebda nitrifikazzjoni. Ikun meħtieġ sors alternattiv ta' ħama attivata, jekk it-testijiet kellhom jikkunsidraw l-effetti fuq il-mikro-organiżmi eterotrofiċi u nitrifikanti. Test finali jitwettaq jekk ikun hemm evidenza ta' rati ta' teħid tal-ossiġenu suppressi b'konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test differenti.

Kalkolu tal-perċentwal tal-inibizzjoni

52. Il-perċentwal tal-inibizzjoni, I_T, tal-konsum tal-ossiġenu totali f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, jiġi kkalkolat bl-Ekwazzjoni 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Bl-istess mod, il-perċentwal ta' inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu eterotrofiku, I_H, f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, jiġi kkalkolat bl-Ekwazzjoni 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Fl-aħħar nett, l-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni, I_N, f'kull konċentrazzjoni, tiġi kkalkolata bl-Ekwazzjoni 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Il-perċentwal tal-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu għandu jiġi pplottjat mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (kurva ta' inibizzjoni, ara Fig.3 tal-Appendiċi 4). Il-kurvi ta' inibizzjoni jiġu pplottjati għal kull perjodu ta' arjazzjoni ta' 3 sigħat jew addizzjonalment wara 30 minuta. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi t-teħid tal-ossiġenu sa 50 % (EC_{50}) għandha tiġi kkalkolata jew interpolata mill-graff. Jekk tkun disponibbli dejta xierqa, il-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % ta' EC_{50}, il-gradjent tal-kurva, jistgħu jiġu kkalkolati jew interpolati l-valuri xierqa biex jiġi mmarkat il-bidu tal-inibizzjoni (pereżempju, EC_{10} jew EC_{20}) u t-tmiem tal-medda ta' inibizzjoni (eż., EC_{80} jew EC_{90}).

56. Għandu jiġi nnotat li fid-dawl tal-varjabbiltà li ħafna drabi tiġi osservata fir-riżultati, f'ħafna każijiet jaf ikun suffiċjenti li r-riżultati jiġu espressi skont id-daqs, pereżempju:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l sa 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l sa 100 mg/l

EC_{50} > 100 mg/l

Interpretazzjoni tar-riżultati

EC_x

▼M6

57. Il-valuri EC_x inkluż il-limiti ta' kunfidenza baxxi u superjuri assoċjati tagħhom ta' 95 % għall-parametru huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni loġistika jew Weibull, metodu Spearman-Karber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi (11)). EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC_{50} jew kwalunkwe EC_x, il-medji għal kull trattament (x) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-rigressjoni.

Stima NOEC

58. Jekk analiżi statistika hija maħsuba biex tiddetermina l-NOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa skont id-Dokument tal-OECD dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta Ekotossika: Gwida għall-Applikazzjoni (11). B'mod ġenerali, l-effetti avversi tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (iżgħar) bi tmiem wieħed f'$p \leq 0,05$.

Rapport tal-ittestjar

59. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test

— isem komuni, isem is-sustanza kimika, numru CAS, purità;

— il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log K_{ow}, is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-kostant ta' Henry (H) u informazzjoni possibbli dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test, eż. adsorbiment mal-ħama attivata);

Sistema tat-test

— sors, kundizzjonijiet ta' operazzjoni tal-impjant ta' trattament tal-ilma mormi u l-influwent li jirċievi, il-konċentrazzjoni, it-trattament minn qabel u ż-żamma tal-ħama attivata;

Kundizzjonijiet tat-test

— it-temperatura tal-ittestjar, il-pH matul l-ittestjar u d-durata tal-fażi(jiet) ta' espożizzjoni;

Riżultati

— konsum speċifiku tal-ossiġenu tal-kontrolli (mg O_2/(g × h ta' ħama);

— id-dejta mkejla, il-kurva(i) ta' inibizzjoni u l-metodu għall-kalkolu ta' EC_{50};

— EC_{50} u, jekk ikun possibbli, 95 fil-mija tal-limiti ta' kunfidenza, possibbilment EC_{20}, EC_{80}; possibbilment NOEC u l-metodi statistiċi użati, jekk EC_{50} ma jistax jiġi ddeterminat;

— ir-riżultati għall-inibizzjoni totali, u jekk tkun meħtieġa eterotrofika u nitrifikanti;

— teħid ta' ossiġenu abijotiku fil-kontroll fiżikokimiku (jekk jintuża);

— l-isem tas-sustanza kimika ta' referenza u r-riżultati b'din is-sustanza kimika;

— l-osservazzjonijiet u d-devjazzjonijiet kollha mill-proċedura standard, li setgħu jinfluwenzaw ir-riżultat.

LETTERATURA

(1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼M6

(2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼**M6**

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

EC_x (Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organiżmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

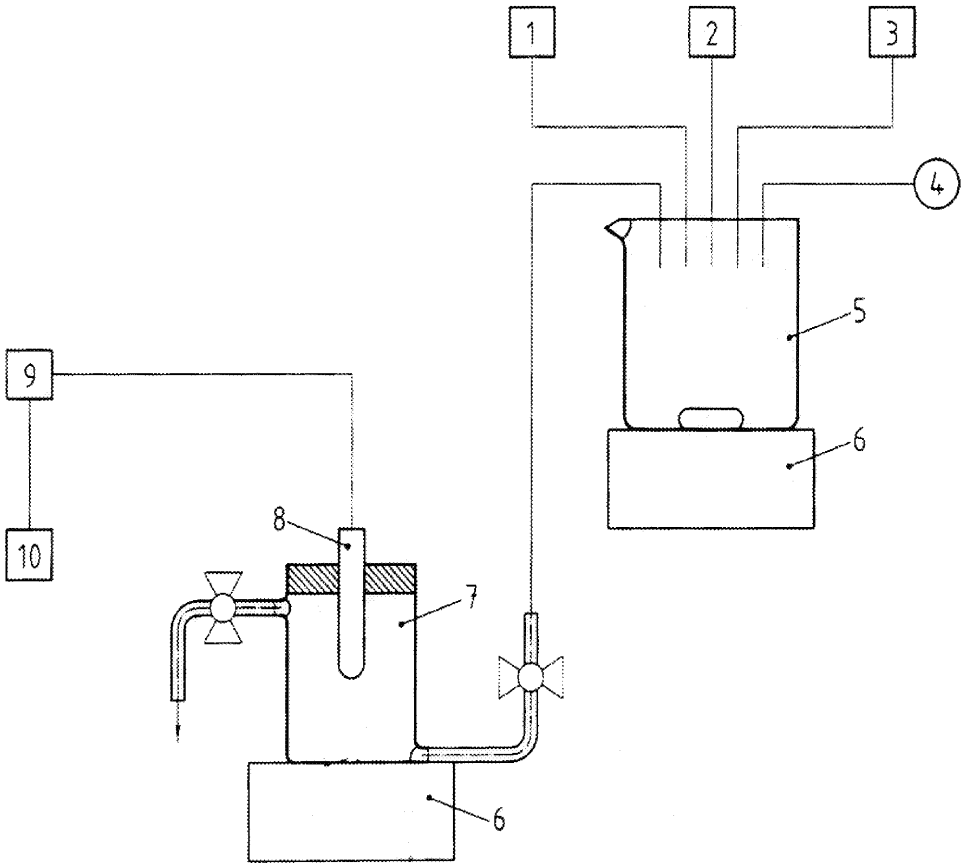
NOEC (konċentrazzjoni bla effett osservat) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼**M6**

Appendiċi 2

Fig. 1: **Eżempji għall-kejl tal-unità**



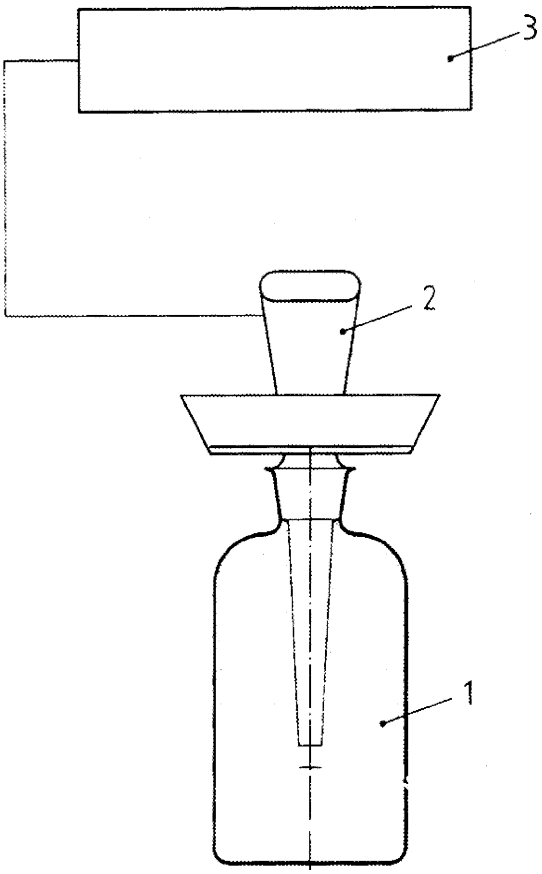
Spjega

1	ħama attivata	6	ħawwad manjetiku
2	midjum sintetiku	7	ċellola li tkejjel l-ossiġenu
3	sustanza kimika tat-test	8	elettrodu tal-ossiġenu
4	arja	9	strument li jkejjel l-ossiġenu
5	reċipjent tat-taħlit	10	reġistratur

▼**M6**

Appendiċi 3

Fig. 2: **Eżempju tal-unità tal-kejl, permezz ta' flixkun BOD**



Spjega

1 Reċipjent tal-ittestjar

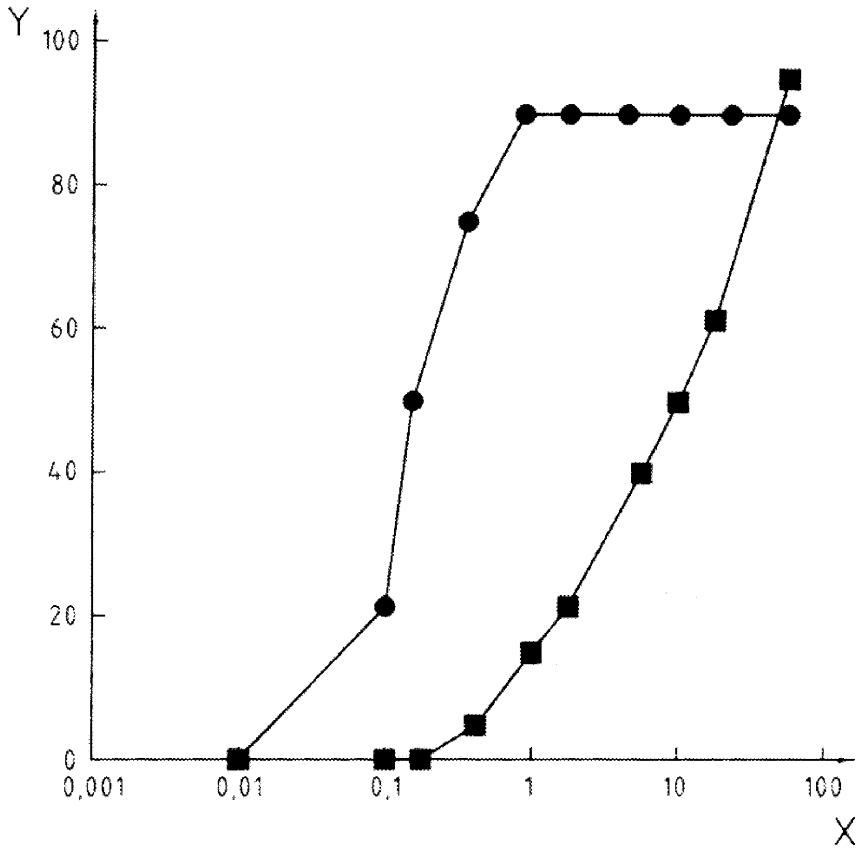
2 elettrodu tal-ossiġenu

3 strument li jkejjel l-ossiġenu

▼**M6**

Appendiċi 4

Fig. 3: **Eżempji ta' kurvi tal-inibizzjoni**



Spjega

X konċentrazzjoni ta' 3,5-dichlorophenol (mg/l)

Y Inibizzjoni (%)

■ respirazzjoni eterotrofika tal-inibizzjoni permezz ta' ħama nitrifikanti

● nitrifikazzjoni tal-inibizzjoni permezz ta' ħama nitrifikanti.

▼B

C.12. **BIJODEGRADAZZJONI**

TEST SCAS MODIFIKAT

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

L-għan tal-metodu huwa l-valutazzjoni tal-bijodegrabilità aħħarija potenzali tas-sostanzi organiċi li jinħallu fl-ilma u li ma jinxfux malajr meta esposti għall-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin ta' mikrorganiżmi fuq perjodu ta' żmien twil. Il-vijabbilità tal-mikrorganiżmi hija mantenuta fuq dan il-perjodu biż-żieda ta' kuljum ta' dħul ta' drenaġġ. (Għar-rekwiżiti fi tmiem il-ġimgħa, id-drenaġġ jista' jinżamm f'temperatura ta' 4° C. Alternattivament, id-drenaġġ sintetiku tat-test konfermatorju OECD jista' jintuża.)

L-assorbiment fiżiko-kemikali tal-biċċiet sospiżi jista' jseħħ, u dan għandu jitqies meta jiġu interpretati r-riżultati (ara 3.2.).

Minħabba l-perjodu twil ta' detenzjoni tal-faži likwida (36 siegħa), u ż-żieda intermittenti tan-nutrijenti, t-test ma jistimulax il-kondizzjonijeit esperjenzati fl-impjant tat-trattament tad-drenaġġ. Ir-riżultati miksuba mill-varji sostanzi tat-test jindikaw li t-test għandu potenzal għoli ta' biodegradazzjoni.

Il-kondizzjonijiet provduti mit-test huma favorevoli ħafna għall-għażla u/jew l-adattazzjoni ta' mikrorganiżmi kapaċi jiddegradaw il-kompost tat-test. (Il-proċedura tista' tkun użata wkoll sabiex tipproduċi inocula akkliatizzati għall-użu tagħhom f'testijiet oħrajn.)

F'dan il-metodu, l-kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbon organiku maħlul huwa użat sabiex jistima l-bijodegrabilità aħħarija tas-sostanzi tat-test. Huwa preferibbli li jiġi ddeterminat id-DOC wara l-aċidifikazzjoni u l-tindif milli bħala d-differenza Ctotali – Cinorganika

L-użu simultaneju ta' metodu speċifiku analitiku jista' jippermetti l-istima tad-degradazzjoni primarja tas-sostanza (ma jibqax tidher l-istruttura tal-kimika oriġinali).

Il-metodu huwa applikabbli biss għal dawk is-sostanzi organiċi tat-test li, bil-konċentrazzjoni użata fit-test:

— jinħallu fl-ilma (ta' l-anqas 20mg organiku maħlul karbon/litru),

— għandhom pressjoni ta' l-istijm negliġibbli,

— m'humiex inibittorji għall-batteri,

— m'humiex assobiti b'mod sinifikattiv fis-sistema tat-test,

— m'humiex mitlufa b'fowming mit-taħlita tat-test.

Il-kontentut tal-karbon organiku tal-materjal tat-test għandu jiġi stabbilit.

▼B

Informazzjoni fuq il-porzjonijiet relattivi tal-komponenti l-maġġuri tal-materjal tat-test tkun bżonnjuża sabiex jiġu interpretati r-riżultati miksuba, partikolarment f'dawk il-każijiet fejn ir-riżultati huma baxxi jew marġinali.

Informazzjoni fuq it-tossiċità għall-mikrorganiżmi tas-sostanza tista' tkun bżonnjuża sabiex tinterpreta r-riżultati baxxi u fl-għażla ta' konċentrazzjoni xierqa tat-test.

1.2. DEFINIZZJONJIET U UNITAJIET

C_T = konċentrazzjoni tal-kompost tat-test bħala karbon organiku kif jinstab jew miżjud mad-drenaġġ li jkun qagħad fil-bidu tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru),

C_t = konċentrazzjoni ta' karbon organiku maħlul li jinstab fit-taħlita supernatanta tat-test fit-tmien tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru),

C_c = konċentrazzjoni ta' karbon organiku maħlul li jinstab fit-taħlita supernatanta tal-kontroll fit-tmien tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru).

Il-biodegradazzjoni hija definita b'dan il-metodu bħala l-iskopariment tal-karbon organiku. Il-biodegradazzjoni tista' tiġi espressa bħala:

1. Il-perċentwal tat-tneħħija ta' D_{da} ta' l-ammont tas-sostanza miżjuda kuljum:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

fejn

D_{da} = degradazzjoni/żieda ta' kuljum.

2. Il-perċentwali tat-tneħħija D_{ssd} ta' l-ammont tas-sostanza fil-bidu ta' kull jum:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

fejn

D_{ssd} = degradazzjoni/bidu ta' sostanza tal-ġurnata;

l-indiċi i u (i + 1) jirreferu għall-ġurnata li fiha sar il-kejl.

Il-formula 2(a) hija rrakkomandata jekk l-effluwent DOC ivarja minn jum għal jum, filwaqt li l-formula 2(b) tista' tkun użata meta l-effluwent DOC jibqa' relattivament kostanti minn ġurnata għall-oħra.

▼B

1.3. SOSTANZI TA' REFERENZA

Fċerti każijiet, meta xi sostanza ġdida tkun qed tiġi investigata, s-sostanzi ta' referenza jistgħu jkunu ta' benefiċċju, però, m'hi rakkomandata l-ebda sostanza ta' referenza hawnhekk.

Id-*data* fuq bosta komposti evalwati fit-testijiet ring huma provduti (ara l-Appendiċi 1) primarjament sabiex il-kalibrazzjoni tal-metodu tkun tista' ssir minn żmien għall-ieħor u sabiex tippermetti tqabbil tar-riżultati meta jkun applikat metodu ieħor.

1.4. METODU PRINĊIPALI TAT-TEST

Tajn attivat minn impjant tat-trattament tad-drenaġġ huwa mpoġġi f'unità ta' tajn attivat semikontinwu (SCAS). Il-kompost tat-test u d-drenaġġ li jkun qagħad huma miżjuda, u t-taħlita hija aerjata għall-23 siegħa. L-aerjazzjoni hija imbagħad imwaqqfa, it-tajn joqgħod u t-taħlita supernatanta hija mneħħija.

It-tajn li jkun baqa' fil-kontenitur ta' aerjazzjoni huwa imbagħad imħallat ma' alikwot ieħor tal-kompost tat-test u d-drenaġġ, u ċ-ċiklu huwa imbagħad ripetut.

Il-bijodegradazzjoni hija stabbilita bid-determinazzjoni tal-kontenut tal-karbon organiku maħlul fit-taħlita supernatanta. Il-valur huwa imbagħad imqabbel ma dak misjub għat-taħlita miksuba mit-tubu ta' kontroll bid-doża tad-drenaġġ li qagħad.

Meta huwa użat metodu speċifiku analitiku, t-tibdil fil-konċentrazzjoni tal-molekula oriġinali minħabba l-biodegradazzjoni tista' tiġi mkejla (bijodegrabilità primarja).

1.5. KRITERJI TAL–KWALITÀ

Ir-reproduċibilità ta' dan il-metodu bbażata fuq it-tneħħija tal-karbon organiku maħlul għada ma ġietx stabilita. (Meta tiġi kkonsidrata l-bijodegradazzjoni primarja, hija miksuba *data* preċiża ħafna għall-materjali li huma degradati estensivament.)

Is-sensittività tal-metodu hija ddeterminata ħafna mill-varjabbilità tal-blank u, xi ftit inqas, mill-preċiżjoni tad-determinazzjoni tal-karbon organiku maħlul u l-livell tal-kompost tat-test fit-taħlita fil-bidu ta' kull ċiklu.

1.6. DESKRIZZJONI TAL–PROĊEDRA TAT-TEST

1.6.1. *Preparazzjonijiet*

Nurmu suffiċjenti ta' unitajiet ta' aerjazzjoni nodfa, tista' tiġi użata. l-unità SCAS ta' 1,5 litru oriġinali u tubi li jdaħħlu l-arja (Figura 1) għall-kull sostanza tat-test u l-kontrolli huma mibnijin. Arja kkompressata fornita lill-unitajiet tat-test, mnaddfa b'tajjara, għandhom ikunu nodfa mill-karbon organiku u presaturati bl-ilma sabiex jiġu mnaqqas t-telf minħabba l-evaporazzjoni.

Kampjun ta' taħlita, li fiha 1 sa 4 gr solidi/litru sospensjoni, hija miksuba mill-impjant tat-tajn attivat li jitratta predominament d-drenaġġ domestiku. Madwar 150 ml tat-taħlita huma meħtieġa għall-kull unità ta' aerjazzjoni.

▼B

Taħlit ta' l-istokk tas-sostanza tat-test hija ppreparata fl-ilma distillate; il-konċentrazzjoni normalment meħtieġa hija ta' 400 mg/litru bħala karbon organiku li tagħti konċentrazzjoni tal-kompost tat-test ta' 20 mg/litru fil-bidu ta' kull ċiklu ta' aerjazzjoni jekk ma sseħħ l-ebda bijodegradazzjoni.

Konċentrazzjonijiet ogħla huma permessi jekk it-tossiċità tal-mikroganiżmi tippermettiha.

Il-kontenut tal-karbon organiku tat-taħlita ta' l-istokk hija mkejla.

1.6.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

It-test għandu jsir f'temperatura ta' bejn 20 sa 25 °C.

Għandha tintuża konċentrazzjoni għolja tal-mikorganiżmi (minn 1 sa 4 g/litru ta' solidi sospiżi), u l-perjodu effettiv ta'detenzjoni huwa ta' 36 siegħa. Il-materjal karbonaċeju fid-drenaġġ huwa estensivament ossidizzat, normalment fi tmien siegħat wara li jkun inbeda ċ-ċiklu ta' aerjazzjoni. Wara dan, it-tajn jirrespira endoġenament għall-bqijja tal-perjodu ta' aerjazzjoni, waqt dan il-perjodu l-uniku sostratt għad-disposizzjoni huwa l-kompost tat-test sakemm dan ma jkunx diġa metabolizzat. Dawn il-fatturi, kkombinati mar-reinokulazzjoni ta' kuljum tat-test meta d-drenaġġ domestiku huwa użat bħala l-materjal, jagħti kondizzjonijiet favorevoli kemm għall-akklimatizzazzjoni u l-livelli għoljin ta' biodegradazzjoni.

1.6.3. *Kif isir it-test*

Kampjun ta' taħlita minn impjant xieraq li jittratta predominalment tajn attivat jew unità tal-laboratorju huwa miksub u miżmum aerobiku sakemm dan ikun użat fil-laboratorju. Kull unità ta' aerjazzjoni kif ukoll l-unità ta' kontroll huma mimlijin b' 150ml tat-taħlita (jekk l-unita' oriġinali SCAS hija użata, immoltiplika l-volumi mogħtija b' 10 darbiet) u l-aerjazzjoni b'hekk tkun bdiet. Wara 23 siegħa, l-aerjazzjoni hija mwaqqfa u t-tajn jitħalla joqgħod għall-45 minuta. It-tapp ta' kull kontenitur jinfetaħ, u għandhom jittieħdu porzjonijiet ta' 100 ml tat-taħlita supernatanta. Kampjun ta' drenaġġ domestiku huma miksuba immedjatament qabel l-użu, u 100 ml għandhom jiġu miżjuda mat-tajn rimanenti f'kull unità ta' aerjazzjoni. L-aerjazzjoni għandha terġa tinbeda. F'dan l-istadju m'għandhom jiġu miżjuda l-ebda materjali tat-test, u l-unitajiet huma mitmuma kuljum bid-drenaġġ domestiku biss sakemm it-taħlita supernatanta hija miksuba wara li jkun tħalla jitqiegħed. Dan normalment jieħu sa ġimgħatejn, li sa dak iż-żmien il-karbon organiku maħlul fit-taħlita supernatanta fl-aħħar taċ-ċiklu ta' aerjazzjoni twassal għal valur kostanti.

Fit-tmiem ta' dan il-perjodu, it-tajn individwali li jkun qagħad huma mħallta, u għandu jiżdied 50 ml tat-tajn kompost li jirriżulta ma kull unità.

95 ml tad-drenaġġ li jirriżulta u 5 ml ta' ilma huma miżjuda ma' l-unitajiet ta' kontroll, u 95 ml tad-drenaġġ trattat u 5 ml tal-kompost xieraq tat-taħlita ta' l-istokk (400 mg/litru) huma miżjuda ma' l-unitajiet tat-test. L-aerjazzjoni għandha terġa tinbeda u tkompli għal 23 siegħa. It-Tajn imbagħad għandu jitħalla joqgħod għal 45 minuta u s-supernatant jittieħed u annalizzat għall-kontenut ta' karbon organiku.

Il-proċedura ta' mili u tneħħija hija ripetuta regoalrment kuljum.

▼B

Qabel ma jitħalla joqgħod, jaf ikun neċessarju li l-unitajiet jinaddfu sabiex jipprevjenu l-akkumulazzjoni ta' solidi 'l fuq mil-livell tal-likwidu. Barraxa differenti għandha tintuża għal kull unità sabiex tiġi evitat l-kontaminazzjoni.

Idejalment, il-karbonju organiku maħlul fit-taħlita supernatanta hija determinata kuljum, għalkemm analiżi inqas frekwenti tista' ssir ukoll. Qabel l-analiżi, it-taħlit huma ffiltrati permezz ta' filtri tal-membrena maħsula ta' 0,45 μm jew ċċentrifugati. Il-filtri tal-membrena huma xierqa jekk huwa assigurat li dawn ma jirrilaxxawx il-karbonju jew li ma jixorbux is-sostanza fil-fażi tal-filtrazzjoni. It-temperatura tal-kampjun ma tistgħax taqbeż l-40 °C waqt li tkun qegħdha fiċ-ċentrifugu.

It-tul tat-test tal-komposti li juru ftit jew xejn biodegradazzjoni hija indeterminata, imma l-esperjenza tissuġġerixxi li din għandha tkun ta' l-anqas ta' 12-il ġimgħa, imma ta' mhux aktar minn 26 ġimgħa.

2. **DATA U VALUTAZZJONI**

Il-valuri tal-karbon organiku maħlul fit-taħlit supernatant ta' l-unitajiet tat-test u l-unitajiet ta' kontrol huma mpinġija mal-ħin.

Kif tkun qed iseħħ il-biodegradazzjoni, il-livell misjub fit-test għandu jersaq lejn misjub għall-kontroll. La darba d-differenza bejn iż-żewġ livelli hija misjuba bħala waħda kostanti fuq it-tlett kejliet konsekutivi, in-numru meħtieġ ta' iktar kejl kif hemm bżonn sabiex ikun jista' jsir trattament statistikali tad-data u l-perċentwali tal-biodegradazzjoni tal-kompost tat-test huwa kkalkolat (D_{da} jew D_{ssd}, ara 1.2).

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jkollu dan li ġej:

— l-informazzjoni kollha fuq it-tip ta' drenaġġ, t-tip ta' unitajiet użati u r-riżultati esperimentali dwar is-sostanza ttestjata, is-sostanza ta' referenza jekk użata, u l-blank,

— it-temperatura,

— il-kurva ta' tneħħija bid-deskrizzjoni, mod ta' kalkolazzjoni (ara 1.2.),

— d-data u l-lokazzjoni fejn, ittieħed il-kampjun tat-tajn attivat u d-drenaġġ, status ta' adattazzjoni, konċentrazzjoni, eċċ..,

— raġunijiet xjentifiċi għall-xi tibdil fil-proċedura tat-test,

— firma u data.

▼B

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Minħabba li s-sostanza li għandha tiġi ttestjata b'dan il-metodu mhux ser tkun biodegradabbli minn qabel, kwalunkwe tneħħija ta' DOC minħabba l-biodegradazzjoni għandha tkun normalment gradwali fuq xi jiem jew ġimgħat, ħlief f'każijiet fejn l-akklimatizazzjoni seħħ malajr kif indikat minn skompariment f'daqqa waħda li jseħħ wara ftit ġimgħat.

Madankollu, l-assorbiment fiżikokemikali jista' xi kultant jkollu rwol importanti; dan huwa indikat meta jkun hemm tneħħija kompleta jew parzjali tad-DOC miżjud. Dak kollu li jiġri sussegwentement jiddependi minn fatturi bħall-gradi ta' assorbiment u l-konċentrazzjoni ta' biċċiet sospiżi fl-effluwenti mormi. Ġeneralment id-differenza bejn il-konċentrazzjoni ta' DOC fil-kontroll u t-test tat-taħlit supernatant jiżdied bil-mod minn valur inizjali baxx u din id-differenza tibqa' fil-valur ġdid għall-bqija ta' l-esperiment, sakemm ma sseħħx l-akklimatizazzjoni.

Jekk għandha ssir distinzjoni bejn il-biodegradazzjoni (jew bijodegradazzjoni parzjali) u l-assorbiment, huma neċessarji li jsiru aktar testijiet. Dan jista' jseħħ f'numru ta' modi, imma l-iktar wieħed konvinċenti huwa l-użu ta' taħlita supernatanta, jew tajn, bħala inoculum f'test baži (preferibbilment test respiromatiku).

Is-sostanzi tat-test li jagħtu rimi mhux assobiv għoli ta' DOC għandhom jitqiesu bħala potenzalment biodegradabbli. Rimi parzjali, mhux assorbiv jindika li ta' l-anqas il-kemikali huwa soġġett għal xi biodegradazzjoni.

Rimi baxx, jew xejn, ta' DOC jista' jseħħ minħabba l-inibizzjoni ta' mikrorganiżmi mis-sostanza tat-test u dan jista' jidher ukoll mill-leża u t-telf tat-tajn, bir-rimi ta' supernatanti turbidi. Dan it-test għandu jiġI ripetut bl-użu ta' konċentrazzjoni iktar baxxa tas-sostanza tat-test.

L-użu tal-metodu analitiku speċifiku jew ta' ^{14}C-labelled sostanza tat-test tista' tippermetti aktar sensittività. Fil-każ ta' compost tat-test ^{14}C, ir-rekupru tal-$^{14}CO_2$ għandu jikkonferma li l-biodegradazzjoni tkun seħħet.

Meta jingħataw ukoll ir-riżultati f'termini ta; biodegradazzjoni primarja, għandha tingħata, sa fejn hu possibbli, spjegazzjoni dwar it-tibdil fl-istruttura kemikali li twassal għat-telf tar-ripons mis-sostanza oriġinali tat-test.

Il-validazzjoni tal-metodu analitiku għandha tingħata flimkien mar-rispons li jinstab mill-materja tat-test blank.

4. **REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, Linji Gwida għat-Testijet, 302 A, Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali.

▼B

Appendiċi 1

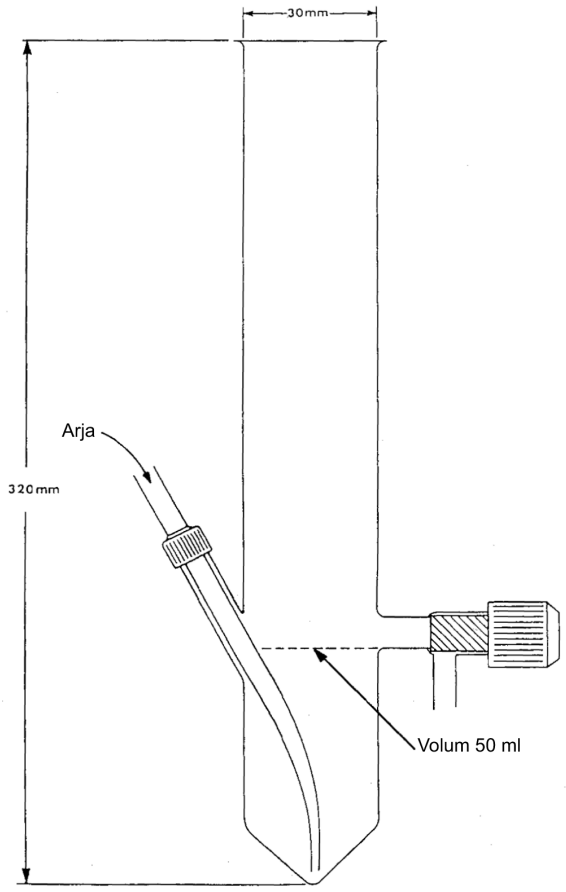
Test SCAS: eżempju tar-riżultati

Sostanza	C_T (mg/1)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Perċentwali tal-biodegradazzjoni D_{da}	Dewmien tat-Test (ġranet)
4-acetyl sulfonat tal-aminobenzene	17,2	2,0	85	40
Sulfonat tat-tetra propylene benzene	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylene tal-glikol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentane tetra Karbossilat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Appendiċi 2

Eżempju ta' l-apparatus tat-test



▼M7

C.13. **BIJOAKKUMULAZZJONI FIL-ĦUT: ESPONIMENT MILWIEM U DJETETIKU**

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 305 tal-OECD (2012). L-għan ewlieni ta' din ir-reviżjoni tal-metodu ta' ttestjar jinqasam fi tnejn. L-ewwel nett, huwa maħsub sabiex jinkorpora test tal-bijoakkumulazzjoni djetetika ([1]) xieraq sabiex jiġi stabbilit il-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi b'solubilità fl-ilma baxxa ħafna. It-tieni, huwa maħsub li jinħoloq metodu ta' ttestjar li, meta xieraq, juża inqas ħut għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, u dan huwa iktar kosteffikaċi.

Fis-snin ta' wara l-adozzjoni tal-metodu ta' ttestjar konsolidat C.13 (1), bosta sustanzi ġew ittestjati, u nkisbet esperjenza konsiderevoli kemm mil-laboratorji kif ukoll minn awtoritajiet regolatorji. Dan wassal għall-fehma li l-kumplessità tat-test tista' titnaqqas jekk jiġu ssodisfati kriterji speċifiċi (ara l-paragrafu 88), u li huwa possibbli li jsir approċċ sekwenzjali. L-esperjenza weriet ukoll li fatturi bijoloġiċi bħat-tkabbir u l-kontenut lipidu ta' ħut jista' jkollhom impatt qawwi fuq ir-riżultati u jaf ikun hemm bżonn li jiġu kkunsidrati. Barra minn hekk, ġie rikonoxxut li l-ittestjar ta' sustanzi ftit li xejn solubbli fl-ilma jaf ma jkunx teknikament fattibbli. Barra minn hekk, għal sustanzi b'solubilità fl-ilma baxxa ħafna fl-ambjent akkwatiku, l-esponiment minn ġol-ilma jista' jkollu importanza limitata meta mqabbla mar-rotta djetetika. Dan wassal għall-iżvilupp ta' metodu ta' ttestjar li fih il-ħut jiġi espost permezz tad-dieta tiegħu (ara l-paragrafi 7-14 u 97 iktar 'il quddiem). Il-validazzjoni (ringtest) tat-test tal-esponiment djetetiku saret fl-2010 (51).

Il-bidliet ewlenin jinkludu:

— L-ittestjar ta' konċentrazzjoni waħda tat-test jista' jitqies li huwa biżżejjed, meta jkun probabbli li l-fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF) ikun indipendenti mill-konċentrazzjoni tat-test.

— Disinn ta' test tal-esponiment milwiem minimizzat li fih ikun possibbli l-użu ta' numru iżgħar ta' punti tal-kampjuni, jekk ikunu ssodisfati kriterji speċifiċi.

— Il-kontenut lipidu ta' ħut għandu jitkejjel sabiex il-BCF ikun jista' jiġi espress fuq bażi ta' kontenut lipidu ta' 5 %.

— Enfasi ikbar fuq l-istima tal-BCF kinetiku (meta possibbli) wara l-istima tal-BCF fl-istat kostanti.

— Għal ċerti gruppi ta' sustanzi, sejjer jiġi propost test tal-esponiment djetetiku, meta dan jitqies li huwa iktar xieraq minn test tal-esponiment milwiem.

— Il-piż tal-ħut għandu jitkejjel sabiex il-BCFk ikun jista' jiġi korrett għad-dilwizzjoni tat-tkabbir.

Qabel ma jsir kwalunkwe wieħed mit-testijiet tal-bijoakkumulazzjoni, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza għat-test:

(a) Is-sensittività tat-teknika analitika għall-kejl tat-tessut u l-konċentrazzjonijiet milwiema jew tal-ikel kemm tas-sustanza tat-test u l-metaboliti possibbli (ara l-paragrafu 65).

(b) Is-solubilità fl-ilma [TM A.6; (2)]; (2)]; dan għandu jiġi stabbilit skont metodu li huwa xieraq għall-medda (stamta) tas-solubilità sabiex jinkiseb valur affidabbli. Għal sustanzi idrofobiċi, dan ġeneralment sejjer ikun il-metodu ta' elwizzjoni tal-kolonna.

([1]) Ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet u unitajiet

▼M7

(c) koeffiċjent tal-partizzjoni tal-n-Ottanol-ilma, K_{OW} ([1]) [TMs A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; jew informazzjoni xierqa oħra dwar imġiba tal-partizzjonar (eż. is-sorbiment għal-lipidi, K_{OC}); dan għandu jiġi stabbilit skont metodu li huwa xieraq għall-medda (stmata) tal-K_{OW} sabiex jinkiseb valur affidabbli. Għal sustanzi idrofobiċi, dan ġeneralment sejjer ikun il-metodu ta' tħawwid bil-galbu [TM A.23 (6)];

(d) L-istabilità tas-sustanza fl-ilma (idroliżi [TM C.7 (7)];

(e) L-istabilità tas-sustanza fl-ikel (speċjalment meta jintgħażel approċċ tat-test tal-esponiment djetetiku);

(f) Informazzjoni dwar il-fototrasformazzjoni rilevanti għall-kundizzjonijiet tal-irradjazzjoni fit-test (8);

(g) It-tensjoni fil-wiċċ (jiġifieri għal sustanzi meta l-log K_{OW} ma jkunx jista' jiġi stabbilit) [TM A.5 (9)];

(h) Pressjoni tal-fwar [TM A.4 (10)];

(i) Kwalunkwe informazzjoni dwar degradazzjoni bijotika jew abijotika fl-ilma, bħal (iżda mhux ristretti għal) bijodegradabilità pronta (TMs C.4 partijiet II sa VII (11), C.29 (12)], fejn xieraq;

(j) Informazzjoni dwar metaboliti: struttura, log K_{OW}, formazzjoni u degradabilità, fejn xieraq;

(k) Kostant ta' dissoċjazzjoni tal-aċidu (pK_a) għal sustanzi li jistgħu jonizzaw. Jekk ikun hemm bżonn, il-pH tal-ilma tat-test għandha tiġi aġġustata sabiex jiġi żgurat li s-sustanza hija fil-forma mhux jonizzata fit-test jekk tkun kompatibbli mal-ispeċi tal-ħut.

Indipendentement mill-metodu ta' esponiment magħżul jew l-iskema ta' kampjunar, dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi proċedura għall-karatterizzazzjoni tal-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi fil-ħut. Għad li r-reġimi tat-test bi fluss kontinwu huma ppreferiti, reġimi semistatiċi huma permessibbli, diment li jkunu ssodisfati l-kriterji tal-validità (ara l-paragrafi 24 u 113). Fir-rotta tal-esponiment djetetiku, is-sistema tal-fluss kontinwu mhijiex neċessara sabiex jinżammu konċentrazzjonijiet milwiema tas-sustanza ttestjata, iżda sejra tgħin sabiex jinżammu l-konċentrazzjonijiet adegwati ta' ossiġenu dissolt u tgħin sabiex jiġi żgurat ilma nadif u jitneħħew l-influwenzi ta', pereżempju, prodotti tal-eskrezzjoni.

Indipendentement mill-metodu ta' ttestjar magħżul, jingħataw biżżejjed dettalji fil-metodu ta' ttestjar għat-twettiq tat-test filwaqt li titħalla libertà adegwata għall-adattament tad-disinn sperimentali għall-kundizzjonijiet b'mod partikolari laboratorji u għall-karatteristiċi varjabbli tas-sustanzi tat-test. It-test tal-esponiment milwiem hija applikata bl-iktar mod xieraq għal sustanzi organiċi stabbli bil-valuri tal-log K_{OW} bejn 1.5 u 6.0 (13) iżda xorta waħda jista' jiġi applikat għal sustanzi ferm idrofobiċi (b'log K_{OW} > 6.0), jekk jista' jintwera li hemm konċentrazzjoni stabbli u kompletament dissolta tas-sustanza tat-test fl-ilma. Jekk ma jistax jintwera li hemm konċentrazzjoni stabbli tas-sustanza tat-test fl-ilma, studju milwiem ma jkunx xieraq u għalhekk ikun meħtieġ approċċ djetetiku għall-ittestjar tas-sustanza fil-ħut (għad li l-interpretazzjoni u l-użu tar-riżultati tat-test djetetiku jistgħu jiddependu mill-qafas regolatorju). L-istimi minn qabel

([1]) Kultant denotat b'P_{OW}; determinat minn metodu tat-tħawwid tal-flask f'TM A.8 (4), metodu tal-HPLC f'TM A.24 (5) u metodu tat-tħawwid tal-flask f'TM A.23 (6). Kultant tintuża t-teknika tal-kolonna ġeneratur għad-determinazzjoni tal-log K_{OW}. Hemm numru limitat ta' studji disponibbli li jużaw din it-teknika, primarjament għal dibenżodiossini u bifenili klorinati (eż. Li and Doucette, 1993) (3). Għal sustanzi li jistgħu jonizzaw, il-log K_{OW} għandu jirreferi għall-forma mhux jonizzata.

▼M7

tal-fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF, kultant imsejjaħ K_B) għal sustanzi organiċi b'valuri tal-log K_{OW} li jaslu sa 9.0 jistgħu jinkisbu bl-użu tal-ekwazzjoni ta' Bintein *et al*.(14) L-istimi minn qabel tal-fattur ta' bijokonċentrazzjoni għal sustanzi tant idrofobiċi tista' tkun ogħla mill-valur tal-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) mistenni li jinkiseb minn esperimenti tal-laboratorju, speċjalment meta jintuża mudell lineari sempliċi għall-istima minn qabel. Il-parametri li jikkaratterizzaw il-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni jinkludu l-kostant tar-rata ta' teħid (k_1), il-kostanti tar-rata ta' telf inkluż il-kostant tar-rata ta' tisfija (k_2), il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}), il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) u l-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika (BMF) ([1]).

Sustanzi tat-test radjotikkettati jistgħu jiffaċilitaw l-analiżi tal-ilma, l-ikel u l-kampjuni tal-ħut u jistgħu jintużaw sabiex jiġi ddeterminat jekk l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-metaboliti humiex neċessarji jew le. Jekk ir-residwi radjuattivi totali jitkejlu waħedhom (eż. b'kombustjoni jew solubilizzazzjoni tat-tessuti), il-BCF jew il-BMF huwa bbażat fuq it-total tas-sustanza priniċipali, kwalunkwe metabolit miżmum u karbonju assimiliat ukoll. Għalhekk, il-valuri tal-BCF jew il-BMF ibbażati fuq ir-residwi radjuattivi totali jaf ma jkunux direttament paragunabbli għal BCF jew BMF derivat minn analiżi kimika speċifika tas-sustanza prinċipali biss. Jistgħu jitħaddmu proċeduri ta' separazzjoni, bħal TLC, HPLC jew GC ([2]) qabel l-analiżi fi studji radjotikkettati sabiex jiġi stabbilit il-BCF jew il-BMF fuq il-bażi tas-sustanza prinċipali. Meta jiġu applikati t-tekniki ta' separazzjoni, għandhom isiru l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni ta' sustanza prinċipali u metaboliti rilevanti ([3]) (ara l-paragrafu 65) jekk il-BCF jew il-BMF sejjer ikun ibbażat fuq il-konċentrazzjoni tas-sustanza prinċipali fil-ħut u mhux fuq ir-residwi radjotikkettati totali. Huwa possibbli wkoll li studju tal-metaboliżmu tal-ħut jew studju tad-distribuzzjoni *in vivo* jiġi kombinat ma' studju tal-bijoakkumulazzjoni skont l-analiżi u l-identifikazzjoni tar-residwi fit-tessuti. Il-possibbiltà ta' metaboliżmu tista' titbassar b'għodod xierqa (eż. toolbox tal-QSAR tal-OECD (15) u programmi proprjetarji tal-QSAR).

Id-deċiżjoni dwar jekk it-twettiq ta' test tal-esponiment milwiem jew djetetika, u f'liema ssettjar, għandha tkun ibbażata fuq il-fatturi fil-paragrafu 3 ikkunsidrati flimkien mal-qafas regolatorju rilevanti. Pereżempju, għal sustanzi, li għandhom log K_{OW} għoli iżda xorta juru solubilità fl-ilma sinifikanti fir-rigward tas-sensittività ta' tekniki analitiċi disponibbli, test tal-esponiment milwiem għandu jiġi kkunsidrat qabel kollox. Madankollu, huwa possibbli li l-informazzjoni dwar is-solubilità fl-ilma mhijiex definittiva għal dawn it-tipi idrofobiċi tas-sustanzi, sabiex il-possibilità ta' tħejjija ta' konċentrazzjonijiet milwiema dissolti stabbli li jistgħu jitkejlu (emulsjonijiet stabbli mhumiex permessi) applikabbli għal studju tal-esponiment milwiem għandha tiġi investigata qabel ma tittieħed deċiżjoni fuq liema metodu ta' ttestjar għandu jintuża (16). Mhuwiex possibbli li tingħata gwida preskrittiva eżatta dwar il-metodu li jrid jintuża fuq il-bażi tal-kriterji "limitu" tas-solubilità fl-ilma u l-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma, peress li fatturi oħrajn (tekniki analitiċi, degradazzjoni, assorbiment, eċċ.) jista' jkollhom influwenza qawwija fuq l-applikabilità tal-metodu għar-raġunijiet spjegati iktar 'il fuq. Madankollu, log K_{OW} ikbar minn 5 u solubilità fl-ilma ta' inqas minn ~0.01 — 0.1 mg/l jindikaw il-medda tas-sustanza fejn l-ittestjar permezz tal-esponiment milwiem jista' jsir dejjem iktar diffiċli.

Fatturi oħrajn li jistgħu jinfluwenzaw l-għażla tat-test għandhom jiġu kkunsidrati, inkluż il-potenzjal tas-sustanza għall-assorbiment tar-reċipjenti tat-test u l-apparat, l-istabilità tagħha f'soluzzjoni milwiema kontra l-istabilità tagħha fl-ikel tal-ħut (17) (18), eċċ.

Informazzjoni dwar aspetti prattiċi bħal dawn tista' tkun disponibbli minn studji milwiema oħrajn li saru. Iktar informazzjoni dwar l-evalwazzjoni tal-aspetti b'rabta mat-twettiq ta' studji tal-bijoakkumulazzjoni hija disponibbli fit-tagħrif (eż. (19)).

Għal sustanzi fejn is-solubilità jew iż-żamma tal-konċentrazzjoni milwiema kif ukoll l-analiżi ta' dawn il-konċentrazzjonijiet ma jimponu ebda restrizzjoni għat-twettiq ta' metodu tal-esponiment milwiem, dan il-metodu huwa ppreferut sabiex jiġi stabbilit il-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanza. Xorta waħda għandu

([1]) Ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet u unitajiet

([2]) TLC: kromatografija fuq saff irqiq; HPLC: kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja; GC: kromatografija b'faži gassuża

([3]) F'ċerti oqfsa regolatorji, l-analiżi tal-metaboliti tista' tkun obbligatorja meta jkunu ssodisfati ċerti kundizzjonijiet (ara l-paragrafu 65).

▼M7

jiġi vverifikat li l-konċentrazzjoni(jiet) tal-esponiment milwiem li tiġi applikata taqa' fi ħdan is-solubilità milwiema fil-medja tat-test. Jistgħu jintużaw metodi differenti għaż-żamma ta' konċentrazzjonijiet stabbli tas-sustanza tat-test dissolta, bħall-użu ta' soluzzjonijiet ewlenin jew sistemi tad-dożaġġ passiv (eż. metodu ta' elwizzjoni tal-kolonna), diment li jkun jista' jintwera li jistgħu jinżammu konċentrazzjonijiet stabbli u l-media tat-test mhumiex mibdulin minn dawk irrakkomandati fil-paragrafu 27.

Għal sustanzi ferm idrofobiċi (log K_{OW} > 5 u solubilità ta' inqas minn ~ 0,01-0,1 mg/l), l-ittestjar permezz tal-esponiment milwiem jista' jsir dejjem iktar diffiċli. Ir-raġunijiet għar-restrizzjonijiet jistgħu jkunu li l-konċentrazzjoni milwiema ma tistax tinżamm f'livell li jitqies li huwa kostanti biżżejjed (eż. dovut għas-sorbiment għall-ħġieġ tal-kontenituri tal-esponiment jew it-teħid rapidu mill-ħut) jew li l-konċentrazzjoni milwiema li sejrin jiġu applikati tant huma baxxi li jaqgħu fl-istess medda daqs jew inqas mil-limitu analitiku ta' kwantifikazzjoni ([1]). Għal dawn is-sustanzi ferm idrofobiċi, it-test djetetiku huwa rakkomandat, diment li t-test ikun konsistenti mal-qafas regolatorju rilevanti u l-ħtiġijiet ta' valutazzjoni tar-riskji.

Għal aġenti tensjoattivi, għandu jiġi kkunsidrat jekk it-test tal-bijokonċentrazzjoni milwiema huwiex fattibbli, fid-dawl tal-proprjetajiet tas-sustanza, inkella aktarx li studju djetetiku jkun iktar adattat. L-aġenti tensjoattivi huma aġenti li jaġixxu fil-wiċċ, li jbaxxu t-tensjoni interfaċjali bejn żewġ likwidi. L-għamla amfifilika tagħhom (jiġifieri fihom parti idrofilika u parti idrofobika) tikkaġuna sabiex dawn jakkumulaw f'interfaċċji bħall-interfaċċja ilma-arja, l-interfaċċja ilma-ikel, u ħitan tal-ħġieġ, xi ħaġa li xxekkel id-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni milwiema tagħhom.

It-test djetetiku jista' jevita wħud mill-aspetti tal-esponiment għal taħlitiet kumplessi b'komponenti ta' limiti differenti tas-solubilità fl-ilma, peress li esponiment komparabbli għall-komponenti kollha tat-taħlita għandu probabilità ikbar li jseħħ fil-metodu milwiem (ara (20)).

Ta' min jgħid li l-approċċ djetetiku jrendi fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetiku (BMF) minflok fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF) ([2]). Hemm approċċi disponibbli sabiex jiġi stmat fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) minn dejta ġġenerata fl-istudju djetetiku (kif diskuss fl-Appendiċi 8, iżda dawn l-approċċi għandhom jintużaw bil-galbu). B'mod ġenerali, dawn l-approċċi jassumu kinetika tal-ewwel ordni, u huma applikabbli biss għal ċerti gruppi ta' komposti. Huwa improbabbli li t-tali approċċi jistgħu jiġu applikati għal aġenti tensjoattivi (ara l-paragrafu 12).

Test tal-esponiment milwiem minimizzat issettjat b'inqas punti tal-kampjunar sabiex jitnaqqas in-numru ta' annimali u/jew riżorsi (ara l-paragrafu 83 u ta' warajh) għandu jiġi applikat biss għal dawk is-sustanzi meta jkun hemm raġuni għaliex wieħed jistenna li t-teħid u d-depurazzjoni sejrin isegwu kinetika tal-ewwel ordni bejn wieħed u ieħor (jiġifieri b'mod ġenerali sustanzi organiċi mhux jonizzati, ara l-paragrafu 88).

C.13 — I **TEST TAL-BIJOKONĊENTRAZZJONI TAL-ESPOSIZZJONI MILWIEMA FIL-ĦUT**

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

It-test jikkonsisti f'żewġ fażijiet: il-fażijiet tal-esponiment (teħid) u ta' wara l-esponiment (tisfija). Matul il-fażi ta' teħid, grupp ta' ħut ta' speċi waħda jiġi espost għas-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni magħżula waħda jew iktar, skont il-proprjetajiet tas-sustanza tat-test (ara l-paragrafu 49). Imbagħad jiġu trasferiti għal medium mingħajr is-sustanza tat-test għall-fażi ta' tisfija. Fażi ta' tisfija dejjem tkun meħtieġa sakemm it-teħid tas-sustanza matul il-fażi ta' teħid ma kienx insinifikanti. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ġo/fuq il-ħut (jew it-tessut speċifiku tieghu) tiġi segwita matul iż-żewġ fażijiet tat-test. Minbarra l-grupp espost, grupp tal-kontroll tal-ħut jinżamm f'kundizzjonijiet identiċi ħlief

([1]) B'mod ġenerali, il-konċentrazzjonijiet imkejlin fl-ilma matul il-fażi ta' teħid għandhom ikunu tal-inqas f'ordni ta' kobor ikbar mil-limitu tal-kwantifkazzjoni sabiex ikunu jistgħu jitkejlu iktar minn nofs ħajja waħda tal-preżenza fil-ġisem fil-fażi ta' tisfija tal-istudju.

([2]) Ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet u unitajiet

▼M7

għan-nuqqas tas-sustanza tat-test, sabiex jiġu konnessi effetti avversi possibbli osservati fit-test tal-bijokonċentrazzjoni għal grupp tal-kontroll li jaqbel u sabiex jinkisbu konċentrazzjonijiet ta' sfond tas-sustanza tat-test ([1]).

Fit-test tal-esponiment milwiem, il-fażi ta' teħid normalment tinfirex fuq 28 jum. Id-durata tista' tittawwal jekk ikun hemm bżonn (ara l-paragrafu 18), jew titqassar jekk jintwera li l-istat stazzjonarju ntlaħaq qabel (ara l-Appendiċi 1, definizzjonijiet u unitajiet) Tbassir tat-tul tal-fażi ta' teħid u l-ħin għall-istat stazzjonarju jista' jsir bl-ekwazzjonijiet fl-Appendiċi 5. Imbagħad jibda l-perjodu ta' tisfija li fih il-ħut ma jibqax espost għas-sustanza tat-test, billi l-ħut jiġi ttrasferit fl-istess medium iżda mingħajr is-sustanza tat-test f'reċipjent nadif. Meta dan ikun possibbli, il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni jiġi kkalkolat kemm bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjoni fil-ħut (C_f) u fl-ilma (C_w) fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}; ara l-Appendiċi 1, definizzjoni) u bħala fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K; ara l-Appendiċi 1, definizzjonijiet u unitajiet), li huwa stmat bħala l-proporzjon tal-kostanti tar-rata ta' teħid (k1) u t-tisfija (k2) filwaqt li tiġi supponuta kinetika tal-ewwel ordni ([2])

Jekk ma jinkisibx stat stazzjonarju fi żmien 28 jum, il-BCF jiġi kkalkolat bl-użu tal-approċċ kinetiku (ara l-paragrafu 38) jew inkella tista' tiġi estiża l-fażi ta' teħid. Jekk dan iwassal għal fażi ta' teħid twila wisq tant li tkun imprattika sakemm jintlaħaq l-istat stazzjonarju (ara l-paragrafi 37 u 38, l-Appendiċi 5), l-approċċ kinetiku huwa ppreferut. Inkella, għal sustanzi ferm idrofobiċi, it-twettiq ta' studju djetetiku għandu jiġi kkunsidrat ([3]), diment li t-test djetetiku jkun konsistenti mal-qafas regolatorju rilevanti.

Il-kostant tar-rata ta' teħid, il-kostant (jew il-kostanti, fejn ikunu involuti mudelli aktar kumplessi) tar-rata ta' tisfija (telf), il-fattur ta' biokonċentrazzjoni (fi stat stazzjonarju u/jew kinetika), u fejn huwa possibbli, il-limiti tal-kunfidenza ta' kull wieħed minn dawn il-parametri huma kkalkolati mill-mudell li jiddeskrivi bl-aħjar mod il-konċentrazzjonijiet imkejlin tas-sustanza tat-test fil-ħut u l-ilma (ara l-Appendiċi 5).

Iż-żieda fil-massa tal-ħut matul it-test sejra tirriżulta fi tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut li qiegħed jikber (l-hekk imsejħa dilwizzjoni tat-tkabbir), u b'hekk il-BCF kinetiku sejjer jiġi sottovalutat jekk ma jiġix ikkoreġut għat-tkabbir (ara l-paragrafi 72 u 73).

Il-BCF huwa bbażat fuq il-konċentrazzjoni totali fil-ħut (jiġifieri għal kull piż niedi totali tal-ħut). Madankollu, għal għanijiet speċjali, jistgħu jintużaw tessuti jew organi speċifiċi (eż. muskolu, fwied) jekk il-ħut ikun kbir biżżejjed jew jekk il-ħut ikun jista' jinqasam fi frazzjonijiet li jittieklu (fletti) u li ma jittieklux (vixxri). Ladarba, għal ħafna sustanzi organiċi, hemm relazzjoni ċara bejn il-potenzjal għall-bijokonċentrazzjoni u l-idrofobiċità, hemm ukoll relazzjoni korrispondenti bejn il-kontenut tal-lipidu tal-ħut tat-test u l-bijokonċentrazzjoni osservata tat-tali sustanzi.

([1]) Għal ħafna mis-sustanzi tat-test, idealment ma għandu jkun hemm ebda individwazzjoni fl-ilma tal-kontroll. Il-konċentrazzjonijiet ta' sfond għandhom ikun rilevanti biss għal materjali li jseħħu naturalment (eż. ċerti metalli) u sustanzi li ssibhom faċilment fl-ambjent.

([2]) Jekk ikun ovvju li l-kinetika tal-ewwel ordni mhijiex segwita, għandhom jintużaw mudelli iktar kumplessi (ara referenzi fl-Appendiċi 5 u għandu jitfittex parir mingħand espert tal-bijostatistika.

([3]) It-teħid jista' jkun limitat minn konċentrazzjonijiet tal-esponiment baxxi minħabba s-solubilità baxxa fl-ilma fit-test ta' bijokonċentrazzjoni, filwaqt li jistgħu jinkisbu konċentrazzjonijiet tal-esponiment ferm ogħla bit-test djetetiku.

▼M7

B'hekk, sabiex jonqos dan is-sors ta' varjabbiltà fir-riżultati tat-test għal dawk is-sustanzi b'lipofiliċità għolja (jiġifieri bil-log K_{OW} > 3), il-bijokonċentrazzjoni għandha tkun espressa bħala normalizzata għal ħut b'kontenut lipidu ta' 5 % (fuq il-bażi tal-piż niedi tal-ġisem sħiħ) minbarra dik derivata direttament mill-istudju. Dan huwa neċessarju sabiex tiġi pprovduta bażi li fuqha jistgħu jitqabblu ma' xulxin ir-riżultati għal sustanzi u/jew speċijiet tat-test differenti. Il-figura ta' kontenut lipidu ta' 5 % intużat spiss peress li tirrappreżenta l-kontenut lipidu medju ta' ħut użat spiss f'dan il-metodu ta' ttestjar (21).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Minbarra l-proprjetajiet tas-sustanza tat-test mogħtija fl-Introduzzjoni (paragrafu 3), informazzjoni oħra meħtieġa hija t-tossiċità għall-ispeċi tal-ħut li sejra tintuża fit-test, idealment l-LC_{50} asintomatika (jiġifieri indipendenti mill-ħin) u/jew it-tossiċità stmata mit-testijiet fil-ħut fit-tul (eż. TMs C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Metodu analitiku xieraq, ta' reqqa, preċiżjoni u sensittività magħrufin, għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test u f'materjal bioloġiku għandu jkun disponibbli, flimkien mad-dettalji tal-preparazzjoni tal-kampjun u tal-ħażna. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni analitika tas-sustanza tat-test kemm fll-ilma kif ukoll fit-tessuti tal-ħut għandu jkun magħruf ukoll. Meta tintuża sustanza tat-test radjotikkettata, għandha tkun tal-ogħla purità (eż. idealment > 98 %) u l-perċentwal tar-radjuattività assoċjat mal-impuritajiet għandu jkun magħruf.

VALIDITÀ TAT-TEST

Sabiex test ikun validu, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

Il-varjazzjoni fit-temperatura tal-ilma hija inqas minn ± 2 °C, għaliex devjazzjonijiet kbar jistgħu jaffettwaw il-parametri bijoloġiċi rilevanti għat-teħid u t-tisfija kif ukoll jikkaġunaw stress għall-annimali;

Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt ma taqax taħt saturazzjoni ta' 60 %;

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-kompartimenti tinżamm fi ħdan ± 20 % tal-medja tal-valuri mkejlin matul il-fażi ta' teħid,

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija taħt il-limitu ta' solubilità tagħha fl-ilma, filwaqt li jitqies l-effett li jista' jkollu l-ilma tat-test fuq is-solubilità effettiva ([1]);

Il-mortalità jew effetti avversi oħrajn/mard kemm fil-ħut tal-kontroll kif ukoll dak tat-trattament huma inqas minn 10 % fi tmiem it-test; fejn it-test jiġi estiż tul ħafna ġimgħat jew xhur, mewt jew effetti avversi oħrajn fiż-żewġ settijiet tal-ħut għandhom ikunu inqas minn 5 % fix-xahar u ma jaqbżux it-30 % b'kollox. Differenzi sinifikanti fit-tkabbir medju bejn il-gruppi tat-test u tal-kontroll tal-ħut kampjunat jistgħu jkunu indikazzjoni ta' effett tossiku tas-sustanza tat-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

L-użu ta' sustanzi ta' referenza b'potenzjal ta' bijokonċentrazzjoni magħruf u metaboliżmu baxx ikun siewi fil-verifika tal-proċedura sperimentali, meta tkun meħtieġa (eż. meta laboratorju ma jkollu ebda esperjenza fl-imgħoddi bit-test jew ikunu nbidlu l-kundizzjonijiet tal-esperiment).

([1]) Għal sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet, għandha tiġi kkunsidrata s-solubilità fl-ilma ta' kull komponent rilevanti sabiex jiġu stabbiliti l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment xierqa.

▼M7

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat l-użu tal-materjali — għall-partijiet kollha tat-tagħmir — li jistgħu jiddisolvu, jassorbu jew jillixivjaw u jkollhom effett avvers fuq il-ħut. Jistgħu jintużaw tankijiet standard rettangolari jew ċilindriċi, magħmula minn materjal kimikament inerti u b'kapaċità adatta b'konformità mar-rata ta' tagħbija (ara l-paragrafu 43). L-użu ta' tubi tal-plastik rotob għandu jitnaqqas kemm jista' jkun. Għandhom jintużaw tubi tal-politetrafluworoeteilen, tal-azzar inossidabbli u/jew tal-ħġieġ. L-esperjenza wriet li għal sustanzi tat-test b'koeffiċjent ta' assorbiment għoli, bħall-piretrojdi sintetiċi, jista' jkun meħtieġ ħġieġ silanizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet, it-tagħmir għandu jintrema wara li jintuża. Idealment is-sistemi tat-test jiġu esposti għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test li sejrin jintużaw fl-istudju għat-tul ta' żmien meħtieġ sabiex tintwera ż-żamma ta' konċentrazzjonijiet tal-esponiment stabbli qabel l-introduzzjoni tal-organiżmi tat-test.

Ilma

Ġeneralment fit-test jintuża ilma naturali u dan għandu jinkiseb minn sors mhux ikkontaminat u ta' kwalità uniformi. Iżda ilma rikostitwit (jiġifieri ilma demineralizzat b'nutrijenti speċifiċi miżjudin f'ammonti magħrufin) jista' jkun iktar adattat sabiex jiggarantixxi kwalità uniformi tul iż-żmien. L-ilma tad-dilwizzjoni, li huwa l-ilma li jitħallat mas-sustanza tat-test qabel ma tidħol fir-reċipjent tat-test (ara l-paragrafu 30), għandu jkun ta' kwalità li tippermetti li l-ispeċi tal-ħut magħżula tibqa' ħajja għad-durata tal-perjodu ta' akklimatizzazzjoni u l-perjodi tat-test mingħajr ma turi ebda dehra jew imġiba anormali. Idealment, għandu jintwera li l-ispeċi tat-test tista' tibqa' ħajja, tikber u tirriproduċi fl-ilma ta' dilwizzjoni (eż. fil-kultura tal-laboratorju jew test tat-tossità taċ-ċiklu tal-ħajja). L-ilma ta' dilwizzjoni għandu jkun karatterizzat mill-inqas minn pH, ebusija, solidi totali, karbonju organiku totali (TOC ([1])) u, preferibbilment ammonju wkoll, nitrit u alkalinità u, għall-ispeċijiet marini, is-salinità. Il-parametri li huma importanti għall-aktar trattament xieraq tal-ħut mhumiex magħrufin kollha, iżda l-Anness 2 jagħti l-konċentrazzjonijiet massimi rakkomandati għal numru ta' parametri għal ilmijiet ħelwin u marittimi tat-test.

L-ilma ta' dilwizzjoni għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu ta' test. Il-valur tal-pH għandu jkun fil-medda ta' 6.0 sa 8.5 fil-bidu tat-test, iżda matul test speċifiku għandu jkun f'medda ta' ± 0.5 tal-unitajiet tal-pH. Sabiex ikun żgurat li d-dilwizzjoni tal-ilma mhijiex sejra tinfluwenza għalxejn ir-riżultat tat-test (pereżempju, bil-kumplessazzjoni tas-sustanza tat-test) jew taffettwa b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk tal-ħut, għandhom jittieħdu kampjuni kull ċertu żmien għall-analiżi, tal-inqas fil-bidu u fi tmiem it-test. Meta jkun magħruf li l-ilma tad-dilwizzjoni huwa relattivament kostanti fil-kwalità, għandhom jiġu determinati l-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, u Ni), ta' anjoni u katjoni ewlenin (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, u SO_4^{2-}), ta' pestiċidi (eż. pestiċidi organofosforiċi totali u pestiċidi organoklorurati totali), ta' karbonju organiku u ta' solidi sospiżi totali, pereżempju kull tliet xhur. Jekk ikun intwera li l-kwalità tal-ilma ta' dilwizzjoni hija kostanti għal tal-anqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jkunu inqas spissi u l-intervalli jistgħu jittawlu (eż. kull sitt xhur).

Il-kontenut tal-partiċelli naturali kif ukoll il-karbonju organiku totali tal-ilma ta' dilwizzjoni għandu jkun baxx kemm jista' jkun sabiex jiġi evitat assorbiment tas-sustanza tat-test għal materja organika, li jista' jnaqqas il-bijodisponibilità tiegħu u b'hekk jirriżulta f'sottovalutazzjoni tal-BCF. Il-valur massimu aċċettabbli huwa

([1]) It-TOC jinkludi karbonju organiku minn partiċelli u karbonju organiku dissolt, jiġifieri TOC = POC + DOC.

▼M7

ta' 5 mg/l għall-oġġett partikolari (oġġett niexef/xott, li ma jgħaddix il-filtru ta' 0.45 μm) u 2 mg/l għall-karbonju totali organiku (ara Anness 2). Jekk hemm bżonn, l-ilma ta' dilwizzjoni għandu jiġi ffiltrat qabel l-użu. Il-kontribuzzjoni għall-kontenut ta' karbonju organiku fl-ilma tat-test mill-ħut tat-test (eskrezzjonijiet) u mir-residwi fl-ikel għandha tinżamm baxxa kemm jista' jkun (ara l-paragrafu 46).

Soluzzjonijiet tat-Test

Ħejji soluzzjoni ewlenija tas-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni adattata. Idealment is-soluzzjoni ewlenija titħejja billi s-sustanza tat-test tiġi sempliċiment imħallta u mheżża fl-ilma ta' dilwizzjoni. Alternattiva li tista' tkun xierqa f'ċerti każijiet hija l-użu ta' sistema ta' dożaġġ ta' desorbiment tal-faži solida. Ġeneralment mhuwiex rakkomandat li jintużaw solventi u aġenti dispersivi (aġenti solubilizzanti) (ara (25)); madankollu, l-użu ta' dawn il-materjali jista' jkun aċċettabbli sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif suppost, iżda għandu jsir kull sforz sabiex jitnaqqas kemm jista' jkun l-użu tat-tali materjali u l-konċentrazzjoni kritika ta' miċelli ma għandhiex tinqabeż (jekk rilevanti). Solventi li jistgħu jintużaw huma l-aċeton, l-etanol, il-metanol, il-formamid tad-dimetil u l-glikol tat-trietilen; aġenti dispersivi li ntużaw huma Tween 80, metilċelluloża 0.01 % u HCO-40. Il-konċentrazzjoni tas-solvent fil-medium tat-test finali għandha tkun l-istess fit-trattamenti kollha (jiġifieri tkun xi tkun il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test) u ma għandhiex taqbeż il-limiti tat-tossiċità korrispondenti stabbiliti għas-solvent fil-kundizzjonijiet tat-test. Il-livell massimu huwa konċentrazzjoni ta' 100 mg/l (jew 0.1 ml/l). Huwa improbabbli li konċentrazzjoni tas-solvent ta' 100 mg/l sejra tibdel b'mod sinifikanti l-konċentrazzjoni dissolta massima tas-sustanza tat-test li tista' tinkiseb fil-medium (25). Il-kontribuzzjoni tas-solvent (flimkien mas-sustanza tat-test) għall-kontenut kollu tal-karbonju organiku fl-ilma tat-test għandha tkun magħrufa. Matul it-test, il-konċentrazzjoni ta' karbonju organiku totali fir-reċipjenti tat-test ma għandhiex taqbeż il-konċentrazzjoni ta' karbonju organiku li joriġina mis-sustanza tat-test u, jekk jintuża s-solvent jew l-aġent solubilizzanti ([1]), b'iktar minn 10 mg/l (± 20 %). Il-kontenut ta' materja organika jista' jkollu effett sinifikatni fuq l-ammont ta' sustanza tat-test dissolta liberament matul it-testijiet fuq il-ħut bi fluss kontinwu, speċjalment għal sustanzi ferm lipofiliċi. Il-mikroestrazzjoni tal-faži solida (ara l-paragrafu 60) tista' tipprovdi informazzjoni importanti fuq il-proporzjon ta' bejn il-komposti mqabbdin u dawk dissolti liberament, li fosthom dawn tal-aħħar huma supponuti li jirrappreżentaw il-frazzjoni bijodisponibbli. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun inqas mil-limitu ta' solubilità tas-sustanza tat-test fil-media tat-test minkejja l-użu ta' solvent jew aġent solubilizzanti. Għandha tingħata attenzjoni meta jintużaw solventi bijodigradabbli lesti peress li dawn jistgħu jikkawżaw problemi bit-tkabbir ta' batterji fit-testijiet bi fluss kontinwu. Jekk mhuwiex possibbli li titħejja soluzzjoni ewlenija mingħajr ma jintuża aġent solubilizzanti, għandha tiġi kkunsidrata l-idoneità ta' studju ta' esponiment milwiem għall-kuntrarju ta' studju ta' esponiment djetetiku.

Għat-testijiet bi fluss kontinwu, sistema li kontinwament tiddistribwixxi u tiddilwixxi soluzzjoni ewlenija tas-sustanza tat-test (eż. pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) jew sistema ta' dożaġġ ta' desorbiment tal-faži solida hija meħtieġa sabiex tforni l-konċentrazzjonijiet tat-test fil-kompartimenti tat-test. Idealment, għandhom jitħallew jgħaddu tal-inqas ħames sostituti tal-volum minn kull kompartiment tat-test kuljum. Il-modalità tal-fluss kontinwu għandha tkun ippreferuta, iżda fejn din mhijiex possibbli (eż. fejn l-organiżmi tat-test ikunu affettwati b'mod avvers), tista' tintuża teknika semistatika ladarba jkunu ssodisfati l-kriterji ta' validità (ara l-paragrafu 24). Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-ilma ta' dilwizzjoni għandhom ikunu kkontrollati kemm 48 siegħa qabel kif ukoll tal-inqas kuljum matul it-test wara dan. Inkludi f'dan il-kontroll id-determinazzjoni tar-rata tal-fluss minn ġewwa kull kompartiment tat-test u ara li din ma tvarjax b'aktar minn 20 % fi ħdan l-istess kompartiment jew bejn kompartimenti differenti.

([1]) Għad li ġeneralment dan mhuwiex rakkomandat, jekk jintuża solvent jew aġent solubilizzanti, il-karbonju li joriġina minn dan l-aġent għandu jiżdied mal-karbonju organiku mis-sustanza tat-test sabiex tiġi evalwata l-konċentrazzjoni tal-karbonju organiku fir-reċipjenti tat-test.

▼M7

L-għażla tal-ispeċijiet

Kriterji importanti fl-għażla tal-ispeċi huma li dejjem ikunu lesti għad-dispożizzjoni, jistgħu jitkisbu f'daqsijiet konvenjenti u jistgħu jinżammu b'mod sodisfaċenti fil-laboratorju. Kritejri oħrajn għall-għażla tal-ispeċi tal-ħut jinkludu importanza rikreazzjonali, kummerċjali u ekoloġika kif ukoll is-sensittività komparabbli, l-użu b'suċċess fl-imgħoddi, eċċ. Fl-Appendiċi 3 jingħataw l-ispeċijiet tat-test rakkomandati. Jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn iżda l-proċedura tat-test jista' jkollha tiġi adattata sabiex tipprovdi kundizzjonijiet xierqa tat-test. F'dan il-każ, ir-raġuni li tiġġustifika l-għażla tal-ispeċi u l-metodu sperimentali għandhom jiġu rrapportati. B'mod ġenerali, l-użu ta' speċijiet ta' ħut iżgħar sejjer iqassar il-ħin għall-istat stazzjonarju, iżda jista' jkun hemm bżonn ta' iktar ħut (kampjuni) sabiex jiġu analizzati l-kontenut lipidu u l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test b'mod adegwat fil-ħut. Barra minn hekk, huwa possibbli li differenzi fir-rata ta' respirazzjoni u metaboliżmu bejn ħut iżgħar u ikbar fl-età jistgħu jxekklu l-paraguni tar-riżultati bejn testijiet differenti u speċijiet tat-test differenti. Ta' min jinnota li l-ispeċi tal-ħut ittestjata fi stadju tal-ħajja bi tkabbir rapidu (meta jkun għadu qed jikber) jista' jikkomplika l-interpretazzjoni tad-dejta.

Iż-żamma tal-ħut (rilevanti għall-esponiment milwiem u djetetika)

Il-popolazzjoni tal-istokk tal-ħut għandha titħalla dderri għal tal-inqas ġimagħtejn fl-ilma (ara l-paragrafu 28) fit-temperatura u l-għalf tat-test fuq dieta suffiċjenti (ara l-paragrafu 45). Kemm l-ilma kif ukoll id-dieta għandhom ikunu tal-istess tip bħal dawk li sejrin jintużaw matul it-test.

Wara perjodu ta' 48 siegħa li fih il-ħut jitħallew joqogħdu, jiġu rreġistrati l-mortalitajiet u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

— Mortalitajiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: iċħad il-lott sħiħ;

— Mortalitajiet ta' bejn 5 u 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: ħallihom iderru għal sebat ijiem oħra — jekk ikun hemm mortalità ogħla minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, iċħad il-lott sħiħ;

— Mortalitajiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: aċċetta l-lott sħiħ.

Il-ħut użat fit-testijiet għandu jkun ħieles minn mard u anormalitajiet osservabbli. Kwalunkwe ħut marid għandu jitwarrab. Il-ħut ma għandux jirċievi trattament għall-mard fil-gimagħtejn ta' qabel it-test, jew matul it-test.

IT-TWETTIQ TAT-TEST

Test preliminari

Jista' jkun siewi li jsir esperiment preliminari sabiex jiġu ottimizzati l-kundizzjonijiet tat-test tat-test definittiv, eż. l-għażla ta' konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test, id-durata tal-fażijiet ta' teħid u ta' tisfija, jew sabiex jiġi stabbilit jekk hemmx bżonn li jsir test sħiħ. Id-disinn tat-test prelimnari għandu jkun tali li tinkiseb l-informazzjoni metieġa. Jista' jiġi kkunsidrat jekk test minimizzat jista' jkun biżżejjed għall-kisba ta' BCF, jew jekk ikun hemm bżonn li jsir studju sħiħ (ara l-paragrafi 83-95 fuq it-test minimizzat).

Kundizzjonijiet tal-Esponiment

Durata tal-fażi ta' teħid

Tbassir tad-durata tal-fażi ta' teħid jista' jinkiseb mill-esperjenza prattika (eż. minn studju preċedenti jew studju tal-akkumulazzjoni fuq sustanza relatata strutturalment) jew minn ċerti relazzjonijiet empiriċi li jużaw għarfien jew dwar is-solubilità fl-ilma jew il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanza tat-test (diment li t-teħid isegwi l-kinetika tal-ewwel ordni, ara l-Appendiċi 5).

▼M7

Il-fażi ta' teħid għandha ssir għal 28 jum sakemm ma jkunx jista' jintwera li l-istat stazzjonarju ntlaħaq qabel (ara l-Appendiċi 1, definizzjonijiet u unitajiet). Stat stazzjonarju jintlaħaq fil-plott tas-sustanza tat-test fil-ħut (C_f) kontra l-ħin meta l-kurva ssir parallela għall-assi tal-ħin u tlett analiżijiet suċċessivi tas-C_f magħmula fuq kampjuni meħuda fl-intervalli ta' mill-inqas jumejn huma fi ħdan ± 20 % minn xulxin, u ma hemmx żieda sinifikanti ta' C_f fil-ħin bejn l-ewwel u l-aħħar analiżi suċċessivi. Meta jiġu analizzati l-kampjuni miġbura flimkien, hemm bżonn ta' mill-inqas erba' analiżijiet suċċessivi. Għas-sustanzi tat-test li jittieħdu bil-mod, ikun aktar xieraq li l-intervalli jkunu ta' sebat ijiem. Jekk l-istat stazzjonarju ma jintlaħaqx sal-jum 28, il-BCF jiġi kkalkolat bl-użu tal-approċċ kinetiku biss, li ma jiddependix mill-ilħuq tal-istat stazzjonarju, jew inkella l-fażi ta' teħid tista' tiġi estiża, sabiex jittieħdu iktar kejliet, sakemm jintlaħaq l-istat stazzjonarju jew għal 60 jum, skont liema minnhom ikun l-iqsar. Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut fi tmiem il-fażi ta' teħid trid tkun għolja biżżejjed sabiex tiġi żgurata stima affidabbli ta' k_2 mill-fażi ta' tisfija. Jekk ma jkunx hemm teħid sinifikanti wara 28 jum, it-test jista' jitwaqqaf.

Durata tal-fażi ta' tisfija

Għal sustanzi li jsegwu l-kinetika tal-ewwel ordni, perjodu ta' nofs id-durata tal-fażi ta' teħid normalment ikun biżżejjed sabiex iseħħ tnaqqis xieraq (eż. 95 %) fil-preżenza fil-ġisem tas-sustanza (ara l-Appendiċi 5 għall-ispjegazzjoni tal-istima). Jekk il-ħin meħtieġ biex jintlaħaq it-telf ta' 95 % ikun twil b'mod imprattiku, għaliex pereżempju jaqbeż bid-doppju d-durata normali tal-fażi ta' teħid (jiġifieri iktar minn 56 jum), jista' jintuża perjodu iqsar (eż. sakemm il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tiġi inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni tal-istat stazzjonarju). Madankollu, jista' jkun hemm bżonn ta' perjodi ta' tisfija itwal għal sustanzi b'mudelli iktar kumplessi ta' teħid u tisfija minn dawk rappreżentati minn mudell tal-ħut b'kompartiment wieħed li jrendi kinetika tal-ewwel ordni. Jekk jiġu osservati u/jew antiċipati xejriet kumplessi bħal dawn, huwa rakkomandat li jitfittex li jinkiseb parir mingħand espert tal-bijostatistika u/jew tal-farmakokinetika sabiex jiġi żgurat issettjar xieraq tat-test. Peress li l-perjodu ta' tisfija huwa estiż, in-numri ta' ħut għall-kampjunar jista' jkun fattur ta' limitazzjoni u d-differenzi fit-tkabbir bejn il-ħut jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultati. Il-perjodu sejjer jiġi rregolat ukoll mill-perjodu li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut tibqa' ogħla mil-limitu analitiku tal-kwantifikazzjoni.

Numri ta' ħut tat-test

Agħżel in-numri ta' ħut għal kull konċentrazzjoni tat-test b'tali mod li jkun hemm minimu ta' erba' ħutiet disponibbli f'kull punt tal-kampjunar. Il-ħut għandu jingħabar flimkien biss jekk l-analiżi ta' ħuta waħda ma tkunx fattibbli. Jekk ikun hemm skop ta' preċiżjoni ikbar fl-iffittjar tal-kurva (u l-parametri derivati) jew jekk ikun hemm bżonn ta' studji dwar il-metaboliżmu (eż. sabiex issir distinzjoni bejn metaboliti u sustanzi prinċipali meta jintużaw sustanzi tat-test radjotikkettati), sejjer ikun hemm bżonn ta' iktar ħut għal kull punt tal-kampjunar. Il-kontenut lipidu għandu jiġi determinat fuq l-istess materjal bijoloġiku li jintuża sabiex tiġi determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test. Jekk dan ma jkunx fattibbli, jista' jkun hemm bżonn ta' iktar ħut (ara l-paragrafi 56 u 57).

Jekk jintuża ħut adult (jiġifieri li laħaq il-maturità sesswali), dan ma għandux ikun fi stat riproduttiv jew irriproduċa dan l-aħħar (jiġifieri diġà rriproduċa) la qabel u lanqas matul it-test. Għandu jiġi rrapportat ukoll jekk jintużawx irġiel jew nisa jew jekk tintużax taħlita ta' dawn fl-esperiment. Jekk jintużaw iż-żewġ sessi, id-differenzi fit-tkabbir u l-kontenut lipidu bejn is-sessi għandu jkun dokumentat bħala mhux sinifikanti qabel ma jibda l-esponiment, speċjalment jekk ikun antiċipat li l-ġbir flimkien tal-ħut irġiel u nisa sejjer ikun neċessarju sabiex jiġu żgurati konċentrazzjonijiet tas-sustanza u/jew kontenut lipidu identifikabbli.

▼M7

Fi kwalunkwe test, agħżel ħut b'piż simili b'tali mod li l-iżgħar ma jkunux iżgħar minn żewġ terzi tal-piż tal-ikbar. Ilkoll għandhom ikunu tal-istess sena-klassi u ġejjin mill-istess sors. Peress li l-piż u l-età ta' ħuta jista' jkollhom effett importanti fuq il-valuri tal-BCF (12) dawn id-dettalji għandhom jiġu rreġistrati b'mod preċiż. Huwa rakkomandat li sottokampjun tal-istokk tal-ħut jintiżen ftit qabel ma jibda t-test sabiex jiġi stmat il-piż medju (ara l-paragrafu 61).

Tagħbija

Għandhom jintużaw proporzjonijiet għoljin ta' ilma għall-ħut sabiex jonqos it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-kompost tat-test fl-ilma kkaġunat miż-żieda tal-ħut fil-bidu tat-test u anki sabiex jiġi evitat tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt. Huwa importanti li r-rata ta' tagħbija tkun adattata għall-ispeċi tat-test użata. F'kull każ, normalment tkun rakkomandata rata ta' tagħbija ħut-ilma ta' 0.1-1.0 g ħut (piż niedi) għal kull litru fil-ġurnata. Jistgħu jintużaw rati ogħla ta' tagħbija ħut-ilma jekk jintwera li l-konċentrazzjonijiet meħtieġa tas-sustanza tat-test jistgħu jinżammu f'limiti ta' ± 20 %, u li l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt ma taqax taħt 60 % saturazzjoni (ara l-paragrafu 24).

Meta tagħżel ir-reġimi tat-tagħbija xierqa, qis il-ħabitat normali tal-ispeċi tal-ħut. Pereżempju, ħut li jgħix fil-qiegħ jista' jirrikjedi qiegħ tal-akkwarju ikbar għall-istess volum ta' ilma meta mqabbel ma' speċi ta' ħut pelaġiku.

Għalf

Matul il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni u tat-test, itma' dieta xierqa ta' lipidu magħruf u kontenut totali ta' proteina lill-ħut f'ammont biżżejjed sabiex jibqgħu f'kundizzjoni tajba tas-saħħa u jżommu l-piż tal-ġisem (huwa permess ftit tkabbir). Itma' kuljum matul il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni u tat-test f'livell stabbilit skont l-ispeċi użata, il-kundizzjonijiet tal-esperiment u l-valur kaliriku tal-ikel (pereżempju għal trota qawsalla, bejn madwar 1 sa 2 % tal-piż tal-ġisem kuljum). Ir-rata tal-għalf għandha tingħażel b'tali mod li jiġu evitati tkabbir veloċi u żieda kbira fil-kontenut lipidu. Sabiex tinżamm l-istess rata tal-għalf, l-ammont tal-għalf għandu jerġa' jiġi kkalkolat kif xieraq, pereżempju darba fil-ġimgħa. Għal dan il-kalkolu, il-piż tal-ħut f'kull kompartiment tat-test jista' jkun stmat mill-piż tal-ħut li ddaħħal l-aħħar fil-kampjun f'dak il-kompartiment. Tiżinx il-ħut li jifdal fil-kompartiment.

Ikel mhux mittiekel u r-rawt għandhom jinġibdu kuljum mill-kompartimenti tat-test ftit wara t-tagħlif (30 minuta sa siegħa wara). Il-kompartimenti għandhom jinżammu fl-iktar stat nadif possibbli matul it-test sabiex il-konċentrazzjoni ta' materja organika tibqa' baxxa kemm jista' jkun (ara l-paragrafu 29), peress li l-preżenza ta' karbonju organiku tista' tillimita l-bijodisponibilità tas-sustanza tat-test (12).

Peress li ħafna għalf jiġi minn ħut mitħun, għandu jiġi żgurat li l-għalf mhuwiex sejjer jinfluwenza r-riżultati tat-test jew jinduċi effetti avversi, eż. billi jkun fih (traċċi ta') pestiċidi, metalli tqal u/jew is-sustanza tat-test innifisha.

Dawl u temperatura

Huwa rakkomandat fotoperjodu ta' 12 sa 16-il siegħa u t-temperatura (± 2 °C) għandha tkun adattata għall-ispeċi tat-test (ara l-Appendiċi 3). It-tip u l-karatteristiċi tad-dawl għandhom ikunu magħrufin. Għandha tingħata attenzjoni għall-fototrasformazzjoni possibbli tas-sustanza tat-test fil-kundizzjonijiet ta' irradjazzjoni tal-istudju. Għandu jintuża dawl xieraq sabiex jiġi evitat esponiment tal-ħut għal fotoprodotti mhux naturali. F'xi każijiet jista' jkun xieraq li jintuża filtru sabiex ma tidħolx irradjazzjoni tal-UV ta' inqas minn 290 nm.

▼M7

Konċentrazzjonijiet tat-test

Oriġinarjament it-test tfassal għal sustanzi organiċi mhux polari. Għal dan it-tip ta' sustanza, l-esponiment tal-ħut għal konċentrazzjoni waħda huwa mistennij li jkun biżżejjed, peress li ma huwa mistenni ebda effett tal-konċentrazzjoni, għad li jista' jkun hemm bżonn ta' żewġ konċentrazzjonijiet għall-qafas regolatorju rilevanti. Jekk jiġu ttestjati sustanzi barra dan id-dominju, jew ikunu magħrufin indikazzjonijiet oħrajn ta' dipendenza mill-konċentrazzjoni possibbli, it-test għandu jsir b'żewġ konċentrazzjonijiet jew iktar. Jekk tiġi ttestjata konċentrazzjoni waħda biss, għandha tingħata ġustifikazzjoni għall-użu ta' konċentrazzjoni waħda (ara l-paragrafu 79). Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni ttestjata għandha tkun l-inqas konċentrazzjoni possibbli f'livell prattiku u tekniku (jiġifieri mhux qrib il-limitu tas-solubilità).

F'ċerti każijiet jista' jkun antiċipat li l-bijokonċentrazzjoni ta' sustanza tiddependi mill-konċentrazzjoni tal-ilma (eż. għall-metalli, meta t-teħid tas-sustanza mill-ħut jista' jkun irregolat tal-inqas b'mod parzjali). F'dan il-każ, hemm bżonn li jiġu ttestjati tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet, iżda idealment iktar (ara l-paragrafu 49), li jkunu ambjentalment rilevanti. Anki għal sustanzi li fihom il-konċentrazzjonijiet ittestjati jridu jkunu qrib il-limitu tas-solubilità għal raġunijiet prattiċi, huwa rakkomandat li tal-inqas jiġu ttestjati żewġ konċentrazzjonijiet, għaliex dan jista' jagħti idea ta' kemm huma affidabbli l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment. L-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test għandha tinkorpora l-konċentrazzjoni ambjentalment realistika kif ukoll il-konċentrazzjoni li hija rilevanti għall-fini tal-valutazzjoni speċifika.

Il-konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test għandha tingħażel bħala waħda inqas mil-livell tal-effett kroniku tagħha jew 1 % mil-LC_{50} asintomatika akuta tagħha fi ħdan medda ambjentalment rilevanti u tal-inqas ordni ta' kobor ikbar mil-limitu ta' kwantifikazzjoni tagħha fl-ilma bil-metodu analitiku użat. L-ikbar konċentrazzjoni tat-test permissibbli tista' tiġi stabbilita wkoll bid-diviżjoni tal-LC_{50} akuta ta' 96 siegħa bi proporzjon akut/ kroniku xieraq (eż. proporzjonijiet xierqa għal ċerti sustanzi huma madwar tlieta, iżda wħud huma ikbar minn 100). Jekk tintuża t-tieni konċentrazzjoni, din għandha tvarja minn dik ta' hawn fuq b'fattur ta' għaxra. Jekk dan mhuwiex possibbli għaliex il-kriterju tat-tossiċità (li jillimita l-konċentrazzjoni tat-test superjuri) u l-limitu analitiku (li jillimita l-konċentrazzjoni tat-test inferjuri), jista' jintuża fattur ta' inqas minn għaxra u għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' sustanza tat-test radjotikkettata (tal-ogħla prijorità, eż. idealment > 98 %). Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma tintuża ebda konċentrazzjoni li tkun ogħla mil-limitu tas-solubilità tas-sustanza tat-test fil-medja tat-test.

Kontrolli

Kontroll tal-ilma ta' dilwizzjoni wieħed jew, jekk rilevanti (ara l-paragrafi 30 u 31), kontroll wieħed li fih is-solvent għandu jsir ukoll minbarra s-sensiela ta' testijiet.

Il-Frekwenza tal-Kejliet tal-Kwalità tal-Ilma

Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, it-TOC, il-pH u t-temperatura għandhom jitkejlu fir-reċipjenti kollha tat-test u tal-kontroll. L-ebusija u s-salinità totali (jekk rilevanti) għandhom jitkejlu fil-kontroll(i) u f'reċipjent wieħed. Jekk jiġu ttestjati żewġ konċentrazzjonijiet jew iktar, kejjel dawn il-parametri fil-konċentrazzjoni għolja (jew fl-ogħla waħda). Bħala minimu, l-ossiġenu dissolt u s-salinità (jekk relevanti) għandhom jitkejlu tliet darbiet — fil-bidu, madwar in-nofs u fl-aħħar tal-perjodu tal-perjodu ta' teħid — u darba fil-ġimgħa fil-perjodu ta' tisfija. It-TOC għandu jitkejjel fil-bidu tat-test (24 siegħa u 48 siegħa qabel il-bidu tat-test tal-fażi ta' teħid) qabel jiddaħħal il-ħut u mill-inqas darba fil-ġimgħa, kemm matul il-fażi ta' teħid kif ukoll dik ta' tisfija. It-temperatura għandha titkejjel u tiġi rreġistrata kuljum, il-pH fil-bidu u fl-aħħar ta' kull perjodu u l-ebusija darba f'kull test. Idealment, it-temperatura tiġi ssorveljata kontinwament mill-inqas f'reċipjent wieħed.

▼M7

Kampjunar u Analiżi tal-Ħut u l-Ilma

Skeda tal-kampjunar tal-ħut u l-ilma

L-ilma għandu jiġi kampjunat mill-kompartimenti tat-test għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test qabel ma jiddaħħal il-ħut u matul kemm il-fażi ta' teħid kif ukoll ta' tisfija. L-ilma għandu jiġi kampjunat qabel l-għalf, fl-istess ħin bħall-kampjunar tal-ħut. Jista' jkun siewi li l-kampjunar isir iktar spiss sabiex jiġu żgurati konċentrazzjonijiet stabbli wara l-introduzzjoni tal-ħut. Matul il-fażi ta' teħid, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test għandhom jiġu stabbiliti sabiex tiġi verifikata l-konformità mal-kriterji ta' validità (paragrafu 24). Jekk l-analiżijiet tal-kampjun tal-ilma fil-bidu tal-fażi ta' tisfija juru li s-sustanza tat-test mhijiex identifikata, dan jista' jintuża bħala ġustifikazzjoni sabiex ma jitkejjilx l-ilma tat-test u tal-kontroll għas-sustanza tat-test għall-bqija tal-fażi ta' tisfija.

Il-ħut għandu jiġi kampjunat tal-inqas ħames darbiet matul il-fażi ta'teħid u tal-inqas erba' darbiet matul il-fażi ta' tisfija għas-sustanza tat-test. Peress li xi drabi sejjer ikun diffiċli li tiġi kkalkolata stima preċiża raġonevoli tal-valur tal-BCF fuq il-bażi ta' dan in-numru ta' kampjuni (speċjalment meta tkun indikata kinetika li mhijiex dik ta' teħid u tisfija sempliċi tal-ewwel ordni), jista' jkun rakkomandat li l-kampjuni jittieħdu iktar spiss fiż-żewġ perjodi (ara l-Appendiċi 4).

Il-kontenut lipidu għandu jiġi determinat fuq l-istess materjal bijoloġiku li jintuża sabiex tiġi determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tal-inqas fil-bidu u fi tmiem il-fażi ta' teħid u fi tmiem il-fażi ta' tisfija. Jekk dan ma jkunx fattibbli, għandu jittieħed kampjun ta' tal-inqas tliet ħutiet indipendenti sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu tal-istess tliet punti ta' żmien. In-numru ta' ħut għal kull tank fil-bidu tal-esperiment għandu jiġi aġġustat kif xieraq ([1]). Inkella, jekk ma jinstab ebda ammont sinifikanti tas-sustanza tat-test fil-ħut tal-kontroll (jiġifieri ħut mill-popolazzjoni tal-istokk), il-ħut tal-kontroll mit-test jista' jiġi analizzat għal kontenut lipidu biss u l-analiżi tas-sustanza tat-test fil-grupp(i) tat-test (u l-kostant tar-rata ta' teħid relatata, il-kostant tar-rata ta' tisfija u l-valuri tal-BCF) tista' tiġi kkoreġuta għal bidliet skont il-kontenut lipidu tal-grupp tal-kontroll matul it-test ([2]).

Ħut mejjet jew marid ma għandux jiġi analizzat għas-sustanza tat-test jew il-konċentrazzjoni lipida.

Eżempju ta' skeda aċċettabbli tal-kontrolli jingħata fl-Appendiċi 4. Skedi oħrajn jistgħu jiġu kkalkolati minnufih bl-użu ta' valuri supponuti oħrajn ta' K_{OW} sabiex jiġi kkalkolat il-ħin tal-esponiment għal teħid ta' 95 % (irreferi għall-Appendiċi 5 għall-kalkoli).

Il-kampjunar għandu jitkompla matul il-fażi ta' teħid sakemm ikun ġie stabbilit stat stazzjonarju (ara l-Appendiċi 1, definizzjonijiet u unitajiet) jew il-fażi ta' teħid tiġi terminata b'mod ieħor (wara 28 jew 60 jum, ara l-paragrafi 37 u 38). Qabel ma tibda l-fażi ta' tisfija, il-ħut għandu jiġi ttrasferit f'reċipjenti nodfa.

Kampjunar u tħejjija tal-kampjun

Il-kampjuni tal-ilma għandhom jinkisbu għall-analiżi eż. b'sifun minn ġot-tubi inerti minn punt ċentrali fil-kompartiment tat-test. La l-filtrazzjoni u lanqas iċ-ċentrifugazzjoni ma jidhru li dejjem jisseparaw il-frazzjoni mhux bijodisponibbli tas-sustanza tat-test minn dik li hija bijodisponibbli. Jekk tiġi applikata teknika ta' separazzjoni, dejjem għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni għal, jew validazzjoni tat-teknika ta' separazzjoni fir-rapport tat-test minħabba d-diffikultajiet tal-bijodisponibilità (25). B'mod partikolari għal sustanzi ferm idrofobiċi (jiġifieri dawk is-sustanzi b'log K_{OW} > 5) (12) (26), fejn jista' jseħħ l-adsorbiment għall-matriċi tal-filtru jew il-kontenituri ta' ċentrifugrazzjoni, il-kampjuni ma

([1]) Jekk il-kontenut lipidu ma jiġix analizzat fl-istess ħut bħas-sustanza tat-test, il-ħut għandu tal-inqas ikun tal-istess piż u (jekk rilevanti) tal-istess sess.

([2]) Din l-alternattiva hija valida biss jekk il-ħut fil-gruppi tat-test kollha jinżammu f'daqsijiet tal-grupp simili, il-ħut jitneħħa bl-istess mod u jintema' bl-istess mod. Dan jiżgura li t-tkabbir tal-ħut fil-gruppi kollha tat-test ikun simili, jekk il-konċentrazzjoni ttestjata tkun taħt il-medda tossika. Jekk it-tkabbir ikun simili, anki l-kontenut lipidu jkun mistenni li jibqa' simili. Tkabbir differenti fil-kontroll jindika effett tas-sustanza u jinvalida l-istudju.

▼M7

għandhomx ikunu soġġetti għal dawk it-trattamenti. Minflok, għandhom jittieħdu miżuri sabiex it-tankijiet jinżammu nodfa kemm jista' jkun (ara l-paragrafu 46) u l-kontenut tal-karbonju organiku totali għandu jiġi ssorveljat kemm matul il-fażi ta' teħid kif ukoll ta' tisfija (ara l-paragrafu 53). Sabiex jiġu evitati intoppi possibbli b'inqas bijodisponibilità, jista' jintuża l-kampjunar b'tekniki ta' mikroestrazzjoni tal-fażi solida għal sustanzi ftit li xejn solubbli u ferm idrofobiċi.

Il-ħut fil-kampjun għandu jiġi ewtanizzati minnufih, bl-użu tal-iktar metodu xieraq u umanitarju (għal kejl tal-ħut sħiħ, ebda proċess ieħor apparati t-tlaħliħ bl-ilma (ara l-paragrafu 28) u l-ħut għandu jitnixxef bit-taptip). Iżen u kejjel it-tul totali ([1]). F'kull ħuta individwali, il-piż u t-tul imkejlin għandhom ikunu marbutin mal-konċentrazzjoni tas-sustanza analizzata (u l-kontenut lipidu, jekk applikabbli), pereżempju bl-użu ta' kodiċi identifikatur uniku għal kull ħuta kampjunata.

Huwa preferibbli li jiġu analizzati l-ħut u l-ilma immedjatament wara l-kampjunar sabiex tkun evitata degradazzjoni jew aktar telf u sabiex jiġu kkalkolati l-kostanti approssimativi ta' teħid u r-rata ta' tisfija filwaqt li jitkompla t-test. Analiżi minnufih tevita wkoll dewmien fl-istabbiliment ta' jekk intlaħaqx plateau (stat stazzjonarju).

Jekk ma ssirx analiżi immedjata, il-kampjuni għandhom jinħażnu b'metodu xieraq. Qabel ma jibda l-istudju, għandha tinkiseb informazzjoni dwar il-metodu xieraq ta' ħżin għas-sustanza tat-test partikolari — pereżempju, iffriżar profond, żamma f'4 °C, estrazzjoni, eċċ. Id-durata tal-ħżin għandha tingħażel sabiex jiġi żgurat li s-sustanza ma ddegradatx matul il-ħżin.

Kwalità tal-metodu analitiku

Peress li l-proċedura sħiħa hija rregolata essenzjalment mir-reqqa, il-preċiżjoni u s-sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza tat-test, ivverifika b'mod esperimentali li r-reqqa, il-preċiżjoni u r-riproduċibbilità tal-analiżi tas-sustanza, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza tat-test kemm mill-ilma kif ukoll mill-ħut huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari. Dan għandu jkun parti mit-testijiet preliminari. Ara wkoll li s-sustanza tat-test mhijiex fl-ilma ta' dilwizzjoni użat. Jekk ikun hemm bżonn, irranġa l-valuri tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma u l-ħut miksuba mit-test għall-irkupri u l-valuri ta' sfond tal-kontrolli. Il-kampjuni tal-ħut u l-ilma għandhom jiġu mmaniġġjati l-ħin kollu b'tali mod li jnaqqas kemm jista' jkun il-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw mill-adsorbiment bl-apparat tal-kampjunar).

Analizi tal-kampjuni tal-ħut

Jekk fit-test jintużaw materjali radjotikkettati, huwa possibbli li jiġu analizzati għar-radjotikketta totali (jiġifieri prinċipali u metaboliti) jew il-kampjuni jistgħu jitnaddfu sabiex is-sustanza prinċipali tkun tista' tiġi analizzata għaliha. Jekk il-BCF sejjer ikun ibbażat fuq is-sustanza prinċipali, il-metaboliti ewlenin għandhom jiġu kkaratterizzati, tal-inqas fi tmiem il-fażi ta' teħid (ara l-paragrafu 6). Il-metaboliti ewlenin huma dawk li jirrappreżentaw ≥ 10 % tar-residwi totali fit-tessuti tal-ħut, dawk li jirrappreżentaw ≥ 5 % f'żewġ punti tal-kampjunar konsekuttivi, dawk li juru livelli ikbar matul il-fażi ta' teħid, u dawk ta' tħassib

([1]) Minbarra l-piż, it-tul totali għandu jiġi rreġistrat għaliex il-paragun tal-firxa taż-żieda fit-tul matul it-test huwa indikatur tajjeb ta' jekk seħħx effett avvers.

▼M7

tossikoloġiku magħruf. Jekk il-BCF għall-ħut sħiħ f'termini tar-residwi radjotikkettati totali huwa ≥ 500, jista' jkun siewi — u għal ċerti kategoriji ta' sustanzi bħal pestiċidi ferm rakkomandat — li jiġu identifikati u kkwantifikati l-metaboliti ewlenin. Il-kwantifikazzjoni tat-tali metaboliti tista' tkun meħtieġa minn ċerti awtoritajiet regolatorji. Jekk degradati li jirrappreżentaw ≥ 10 % tar-residwi radjotikkettati totali fit-tessut tal-ħut huma identifikati u kkwantifikati, huwa rakkomandat ukoll li mbagħad jiġu identifikati u kkwantifikati d-degradati fl-ilma tat-test. Jekk dan ma jkunx fattibbli, dan għandu jkun spjegat fir-rapport.

Normalment il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun determinata għal kull ħuta individwali mwieżna. Jekk dan ma jkunx possibbli, ir-raggruppar tal-kampjuni f'kull okkażjoni tal-kampjunar jista' jsir iżda r-raggruppar ma jirrestringix il-proċeduri statistiċi li jistgħu jiġu applikati għaddejta, u b'hekk fit-test għandu jkun inkluż numru adegwat ta' ħut sabiex jiġi akkomodat ir-raggruppament mixtieq, il-proċedura statistika u s-saħħa statistika. Ir-referenzi (27) u (28) jistgħu jintużaw bħala introduzzjoni għall-proċeduri tar-raggruppar rilevanti.

Il-BCF għandu jkun espress bħala normalizzat għal ħut b'kontenut lipidu ta' 5 % (fuq il-bażi tal-piż niedi) minbarra dak derivat direttament mill-istudju (ara l-paragrafu 21), sakemm ma jkunx jista' jiġi argumentat li s-sustanza tat-test ma takkumulax primarjament f'lipidi. Il-kontenut lipidu tal-ħut għandu jiġi stabbilit f'kull mument tal-kampjunar, jekk dan ikun possibbli, idealment fl-istess estratt bħal dak prodott għall-analiżi għas-sustanza tat-test, peress li spiss il-lipidi jkollhom jitneħħew mill-estratt qabel ma jkun jista' jiġi analizzat kromatografikament. Madankollu, l-analiżi tas-sustanzi tat-test spiss teħtieġ proċeduri ta' estrazzjoni speċifiċi li jistgħu jikkontradixxu l-metodi ta' ttestjar għad-determinazzjoni lipida. F'dan il-każ (sakemm ikun hemm metodi strumentali xierqa u mhux qerrieda disponibbli), huwa rakkomandat li titħaddem strateġija differenti sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu tal-ħut (ara l-paragrafu 56). Għandhom jintużaw metodi xierqa sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu (20). It-teknika ta' estrazzjoni tal-kloroform/metanol (29) tista' tkun rakkomandata bħala metodu standard (30), iżda l-metodu Smedes (31) huwa rakkomandat bħala teknika alternattiva. Dan il-metodu msemmi l-aħħar huwa kkaratterizzat minn effiċjenza komparabbli ta' estrazzjoni, preċiżjoni għolja, l-użu ta' solventi organiċi inqas tossiċi u faċilità tat-twettiq. Jistgħu jintużaw metodi oħrajn li għandhom preċiżjoni aħjar mill-metodi rakkomandati jekk ikunu ġġustifikati kif xieraq. Huwa importanti li jingħataw id-dettalji dwar il-metodu użat.

Kejl tat-tkabbir tal-ħut

Fil-bidu tat-test, ħames sa għaxar ħutiet mill-popolazzjoni tal-istokk iridu jintiżnu b'mod individwali u jitkejjel it-tul totali tagħhom. Dawn jistgħu jkunu l-istess ħutiet użati għall-analiżi lipida (ara l-paragrafu 56). Il-piż u t-tul tal-ħut użat għal kull kampjun meħud kemm mill-grupp tat-test kif ukoll tal-kontroll għandhom jitkejlu qabel ma ssir l-analiżi kimika jew lipida. Il-kejliet tal-ħut fil-kampjun jistgħu jintużaw sabiex jiġu stmati l-piż u t-tul tal-ħut li jifdal fit-tankijiet tat-test u tal-kontroll (ara l-paragrafu 45).

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

Il-kurva tat-teħid tas-sustanza tat-test għandha tinkiseb bl-ipplottjar tal-konċentrazzjoni tagħha fil-ħut jew fuqu (jew tessuti speċifiċi) fil-fażi ta' teħid kontra l-ħin fuq skali aritmetiċi. Jekk il-kurva laħqet plateau, jiġifieri, issir dejjem iktar asintomatika għall-assi tal-ħin, il-BCF fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) għandu jiġi kkalkolat minn:

$$\frac{C_f at\ steady-state(mean)}{C_w at\ steady-state(mean)}$$

▼M7

L-iżvilupp ta' C_f jista' jkun influwenzat mit-tkabbir tal-ħut (ara l-paragrafu 72 u 73). Il-konċentrazzjoni tal-esponiment medja (C_w) hija influwenzata minn varjazzjoni tul iż-żmien. Jista' jkun mistenni li konċentrazzjoni medja ponderata għall-ħin tkun iktar rilevanti u preċiża għal studji tal-bijoakkumulazzjoni, anki jekk il-varjazzjoni tkun fi ħdan il-medda ta' validità xierqa (ara l-paragrafu 24). Konċentrazzjoni tal-ilma medja ponderata għall-ħin (TWA) tista' tiġi kkalkolata skont l-Appendiċi 5, sezzjoni 1.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) għandu jiġi stabbilit bħala l-proporzjon k_1/k_2, iż-żewġ kostanti tar-rata kinetika tal-ewwel ordni. Il-kostanti tar-rata k_1 u k_2 u BCF_K jistgħu jiġu derivati bl-iffittjar fl-istess ħin tal-fażi ta' teħid kif ukoll dik ta' tisfija. Inkella, k_1 u k_2 jistgħu jiġu stabbiliti b'mod sekwenzjali (ara l-Appendiċi 5 għal deskrizzjoni u paragun ta' dawn il-metodi). Il-kostant tar-rata ta' tisfija (k_2) jista' jkun jeħtieġ li jiġi kkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir (ara l-paragrafu 72 u 73). Jekk ikun ovvju li l-kurva tat-teħid u/jew it-tisfija mhijiex l-ewwel ordni, għandhom jintużaw mudelli iktar kumplessi (ara r-referenzi fl-Appendiċi 5) u għandu jitfittex parir mingħand espert tal-bijostatistika u/jew tal-farmakokinetika.

Dejta dwar il-piż/it-tul tal-ħut

Il-piżijiet niedja u t-tul totali tal-ħut individawli għall-intervalli tal-kampjunar kollha jitqiegħdu f'tabella b'mod separat għall-gruppi tat-test u tal-kontroll matul il-fażijiet ta' teħid (inkluża l-popolazzjoni tal-istokk għall-bidu tat-teħid) u ta' tisfija. F'kull ħuta individwali, il-piż u t-tul imkejlin għandhom ikunu marbutin mal-konċentrazzjoni kimika analizzata, pereżempju bl-użu ta' kodiċi identifikatur uniku għal kull ħuta kampjunata. Il-piż huwa l-kejl ippreferut tat-tkabbir għall-fini ta' korrezzjoni tal-valuri tal-BCF kinetiku għad-dilwizzjoni tat-tkabbir (ara l-paragrafu 73 u l-Appendiċi 5 għall-metodu użat għall-korrezzjoni tad-dejta għad-dilwizzjoni tat-tkabbir).

Korrezzjoni tad-Dilwizzjoni tat-Tkabbir u n-Normalizzazzjoni tal-Lipidi

It-tkabbir tal-ħut matul il-fażi ta' tisfija jista' jbaxxi l-konċentrazzjonijiet kimiċi mkejlin fil-ħut bl-effett li l-kostant totali tar-rata ta' tisfija (k_2) ikun ikbar minn dak li jirriżulta minn proċessi ta' tneħħija (eż. respirazzjoni, metaboliżmu, eġestjoni) waħedhom. Il-fatturi ta' bijokonċentrazzjoni kinetika għandhom jiġu kkoreġuti għad-dilwizzjoni tat-tkabbir. BCF_{SS} sejjer ikun influwenzat mit-tkabbir ukoll, iżda ma hemm ebda proċedura miftiehma disponibbli għall-korrezzjoni ta' BCF_{SS} għat-tkabbir. F'każijiet ta' tkabbir sinifikanti, il-BCF_K, ikkoreġut għat-tkabbir (BCF_{Kg}), għandu jinkiseb ukoll peress li jista' jkun kejl iktar rilevanti tal-fattur ta' bijokonċentrazzjoni. Il-kontenuti lipidi tal-ħut tat-test (li huma ferm assoċjati mal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi idrofobiċi) jistgħu jvarjaw biżżejjed fil-prattika tant li jkun hemm bżonn normalizzazzjoni għal kontenut lipidu tal-ħut stabbilit (5 % w/w) sabiex jiġu ppreżentati l-fatturi tal-bijokonċentrazzjoni kinetika kif ukoll fi stat stazzjonarju b'mod sinifikanti, sakemm ma jkunx jista' jiġi argumentat li s-sustanza tat-test ma takkumulax primarjament f'lipidu (eż. ċerti sustanzi perfluworinati jistgħu jaqbdu mal-proteini). L-ekwazzjonijiet u l-eżempji għal dawn il-kalkoli jistgħu jinkisbu fl-Appendiċi 5.

Sabiex jiġi kkoreġut BCF kinetiku għad-dilwizzjoni tat-tkabbir, il-kostant tar-rata ta' tisfija għandu jiġi kkoreġut għat-tkabbir. Dan il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2g}) huwa kkalkolat billi l-kostant tar-rata ta' tkabbir (k_g, kif miksub mid-dejta dwar il-piż imkejjel) jitnaqqas mill-kostant tar-rata ta' tisfija totali (k_2). Imbagħad jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika kkoreġut għat-tkabbir billi l-kostant tar-rata ta' teħid (k_1) jiġi diviż bil-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2g}) (ara l-Appendiċi 5). F'ċerti każijiet dan l-approċċ ikun f'riskju. Pereżempju, għal sustanzi li jissaffew bil-mod ħafna

▼M7

ttestjati f'ħut li jikber malajr, il-k_{2g} derivat jista' jkun żgħir ħafna u b'hekk l-iżball fiż-żewġ kostanti tar-rati użati sabiex jinkiseb isir kritiku, u f'ċerti każijiet l-istimi tal-kg jistgħu jkunu ikbar mill-k_2. Approċċ alternattiv li jevita l-ħtieġa ta' korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir jinvolvi l-użu ta' dejta dwar it-tisfija tal-massa tas-sustanza tat-test għal kull ħuta (fuq il-bażi tal-ħuta sħiħa) minflok id-dejta tas-soltu dwar il-massa tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-massa tal-ħut (konċentrazzjoni). Dan jista' jinkiseb faċilment peress li t-testijiet skont dan il-metodu ta' ttestjat għandhom jorbtu l-konċentrazzjonijiet tat-tessut irreġistrati mal-piżijiet tal-ħut individwali. Il-proċedura sempliċi għal dan hija spjegata fl-Appendiċi 5. Kun af li l-k_2 xorta waħda għandu jiġi stmat u rrapportat, anki jekk jintuża dan l-approċċ.

Il-fatturi tal-bijokonċentrazzjoni kinetika u fi stat stazzjonarju għandhom jiġu rrapportati wkoll b'rabta mal-kontenut lipidu tal-ħut prestabbilit ta' 5 % (w/w), sakemm ma jkunx jista' jiġi argumentat li s-sustanza tat-test ma takkumulax primarjament f'lipidu. Id-dejta dwar il-konċentrazzjoni tal-ħut, jew il-BCF, huma normalizzati skont il-proporzjon bejn 5 % u l-kontenut lipidu medju (individwali) attwali (f' % piż niedi) (ara l-Appendiċi 5).

Jekk l-analiżijiet kimiċi u lipidi saru fuq l-istess ħut, id-dejta normalizzata għal-lipidu tal-ħut individwali għandha tintuża sabiex jiġi kkalkolat BCF normalizzat għal-lipidu. Inkella, jekk it-tkabbir fil-ħut tal-kontroll u l-ħut espost ikun simili, jista' jintuża l-kontenut lipidu tal-ħut tal-kontroll waħdu għall-korrezzjoni għal-lipidu (ara l-paragrafu 56). Metodu għall-kalkolu ta' BCF normalizzat għal-lipidu huwa deskritt fl-Appendiċi 5.

Interpretazzjoni tar-riżultati

Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'kawtela meta l-konċentrazzjonijiet imkejlin tas-soluzzjonijiet tat-test iseħħu f'livelli qrib il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu analitiku.

Fil-prinċipju, it-tkabbir medju fil-grupp tat-test kif ukoll f'tal-kontroll ma għandux ikun wisq differenti sabiex jiġu eskluży l-effetti tossiċi. Il-kostanti tar-rata ta' tkabbir jew il-kurvi tat-tkabbir taż-żewġ gruppi għandhom jitqabblu permezz ta' proċedura xierqa ([1]).

Kurvi tat-teħid u t-tisfija definiti ċari huma indikazzjoni ta' dejta dwar il-bijokonċentrazzjoni ta' kwalità tajba. Għall-kostanti tar-rati, ir-riżultat ta' test χ^2 ta' kemm joqgħod tajjeb għandu juri li joqgħod tajjeb (jiġifieri perċentwal żgħir ta' żball fil-kejl (32)) għall-mudell ta' bijoakkumulazzjoni, sabiex il-kostanti tar-rati jkunu jistgħu jitqiesu affidabbli (ara l-Appendiċi 5). Jekk tintuża iktar minn konċentrazzjoni tat-test waħda, il-varjazzjoni fil-kostanti ta' teħid/tisfija bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test għandha tkun inqas minn 20 % ([2]). Jekk le, tista' tiġi indikata d-dipendenza fuq il-konċentrazzjoni. Għandhom ikunu rreġistrati d-differenzi sinifikanti osservati fir-rati ta' teħid/tisfija bejn il-konċentrazzjonijiet applikati tat-test u jingħataw l-ispjegazzjonijiet possibbli. Ġeneralment, il-limitu ta' kunfidenza ta' 95 % tal-BCFs minn studju ddisinjati kif xieraq joqrob lejn ± 20 % tal-BCF derivat.

Jekk jiġu ttestjati żewġ konċentrazzjonijiet jew iktar, ir-riżultati taż-żewġ konċentrazzjonijiet jew kollha kemm huma jintużaw sabiex jiġi eżaminat jekk ir-riżultati

([1]) Jista' jsir test-*t* fuq il-kostanti tar-rata ta' tkabbir, sabiex jiġi ttestjat dwar jekk it-tkabbir ivarjax bejn il-grupp tal-kontroll u dak tat-test, jew test-*F* fil-każ ta' analiżi tal-varjanza. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jintuża test tal-proporzjon ta' probabilità jew test-*F* sabiex jgħin fl-għażla tal-mudell tat-tkabbir xieraq (monografff 54 tal-OECD, (32).

([2]) Dawn il-perċentwali jassumu li l-metodi analitiċi huma affidabbli u li n-nofs ħajja hija ta' < 14-il jum. Jekk il-metodi analitiċi jkunu inqas affidabbli jew in-nofs ħajja tiżdied (ħafna), dawn in-numru jsiru ikbar.

▼M7

humiex konsistenti u sabiex jintwera jekk hemmx dipendenza fuq il-konċentrazzjoni. Jekk tiġi ttestjata konċentrazzjoni waħda biss sabiex jitnaqqas l-użu ta' annimali u/jew riżorsi, għandha tingħata ġustifikazzjoni għall-użu ta' konċentrazzjoni waħda.

Il-BCF_{SS} li jirriżulta jkun dubjuż jekk il-BCF_K ikun ferm ikbar mill-BCF_{SS}, peress li dan jista' jkun indikazzjoni li l-istat stazzjonarju ma ntlaħaqx jew li d-dilwizzjoni tat-tkabbir u l-proċessi tat-telf ma ġewx ikkunsidrati. F'każijiet li fihom il-BCF_{SS} ikun ferm ogħla mill-BCF_K, id-derivazzjoni tal-kostanti tar-rata ta' teħid u ta' tisfija għandha tiġi vverifikata għal żbalji u terġa' tiġi evalwata. Proċedura ta' ffittjar differenti tista' ttejjeb l-istima tal-BCF_K (ara l-Appendiċi 5).

Rapport tat-test

Apparti l-informazzjoni dwar is-sustanza tat-test indikata fil-paragrafu 3, ir-rapport tat-test jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

L-għamla fiżika u, fejn rilevanti, il-proprjetajiet fiżjokimiċi;

— Dejta dwar l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ. (inkluż il-kontenut ta' karbonju organiku, jekk xieraq).

— Għal sustanzi multikostitwenti u UVCB (sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti ta' reazzjoni kumplessa u Materjali bijoloġiċi) deskrizzjoni, safejn possibbli, tal-identità kimika tal-kostitwenti individwali u, għal kull wieħed, tal-perċentwal tiegħu mill-massa totali tas-sustanza. Għandu jiġi spjegat fil-qosor kif il-metodu analitiku użat fit-test jirrifletti kejl tal-konċentrazzjoni tas-sustanza; il-proċeduri analitiċi kollha għandhom jiġu deskritti, inklużi l-preċiżjoni tal-metodu, il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu, u l-limitu ta' kwantifikazzjoni.

— Jekk radjotikkettati, il-pożizzjoni preċiża tal-atomu/i tikkettati u l-perċentwal tar-radjuattività assoċjata mal-impuritajiet.

— Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għall-ħut (idealment l-ispeċi tat-test). It-tossiċità għandha tiġi rrapportata bħala LC_{50} akuta fuq 96 siegħa u NOAEC & LOAEC minn studju kroniku (jiġifieri test fi stadju bikri tal-ħajja jew test taċ-ċiklu sħiħ tal-ħajja, jekk disponibbli).

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin tas-sustanza kimika tat-test jew is-sustanza tat-test u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test jew is-sustanza tat-test fil-kundizzjonijiet tal-ħżin jekk kienet maħżuna qabel ma ntużat.

Speċijiet tat-test:

L-isem xjentifiku, ir-razza, is-sors, kwalunkwe pretrattament, l-akklimatizzazzjoni, l-età, is-sess (jekk rilevanti), il-medda tad-daqs (piż u tul), eċċ.

Kundizzjonijiet tat-test:

— Il-proċedura tat-test użata (eż. bi fluss kontinwu jew semistatika); studju regolari jew disinn minimizzat (inklużi raġuni u ġustifikazzjoni).

— It-tip u l-karatteristiċi tal-illuminazzjoni użata u l-fotoperjodu/i.

— Id-disinn tat-test (eż. in-numru u l-kobor tal-kompartimenti tat-test, ir-rata tal-bdil tal-volum tal-ilma, ir-rata ta' tagħbija, in-numru tar-repliki, in-numru tal-ħut għal kull replika, in-numru tal-konċentrazzjonijiet tat-test, it-tul tal-fażijiet ta' teħid u tisfija, il-frekwenza tal-kampjunar għall-kampjuni tal-ħut u tal-ilma),

▼M7

— Metodu tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna u l-frekwenza tar-rinnovar (is-solvent, il-konċentrazzjoni tiegħu u l-kontribuzzjoni tiegħu għall-kontenut ta' karbonju organiku tal-ilma tat-test għandhom jingħataw, meta jintużaw) jew deskrizzjoni tas-sistema ta' dożaġġ alternattiva.

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-mezzi tal-valuri mkejlin u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu li nkisbu bih.

— Is-sors tal-ilma ta' dilwizzjoni, deskrizzjoni ta' kwalunkwe pretrattament, ir-riżultati ta' kwalunkwe wiri tal-ħila tal-ħut tat-test li jgħix fl-ilma, u l-karatteristiċi tal-ilma: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt, il-livelli ta' kloru residwu (jekk imkejla), il-karbonju organiku totali, is-solidi sospiżi, is-salinità tal-medium tat-test (jekk xieraq) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir.

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, l-ebusija, it-TOC, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt; il-metodi użati u l-frekwenza tal-kejliet.

— Informazzjoni ddetaljata fuq l-għalf, eż. it-tip ta' ikel, is-sors, il-komposizzjoni (tal-inqas tal-kontenut lipidu u tal-proteini jekk possibbli), ir-rata tal-għalf magħżula, l-ammont mogħti u l-frekwenza;

— Informazzjoni fuq it-trattament tal-kampjuni tal-ħut u tal-ilma, inklużi d-dettalji dwar il-preparazzjoni, il-ħżin, l-estrazzjoni u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sostanza tat-test u l-kontenut lipidu.

— Il-metodi użati għall-każwalizzazzjoni tat-trattament u l-assenjament tal-ħut għar-reċipjent tat-test.

— Id-data tat-tidħil tal-organiżmi tat-test fis-soluzzjonijiet tat-test u d-durata tat-test.

— Deskrizzjoni tat-testijiet tas-sejbien tal-medda u r-riżultati, jekk disponibbli.

Ir-riżultati:

— Ir-riżultati minn kwalunkwe studju preliminari li sar.

— Il-mortalità tal-ħut tal-kontroll u l-ħut f'kull kompartiment tal-esponiment u kwalunkwe mġiba anormali osservata.

— Informazzjoni dwar kwalunkwe effett avvers osservat.

— Deskrizzjoni sħiħa tal-proċeduri ta' analiżi kimika kollha mħaddmin inklużi l-limiti ta' detezzjoni u l-kwantifikazzjoni, il-varjabbiltà u l-irkupru.

— Il-kontenut lipidu tal-ħut, inkluż il-metodu użat u, jekk derivat, il-fattur ta' normalizzazzjoni tal-lipidu (L_n, fattur sabiex jiġu espressi riżultati relattivi għall-kontenut lipidu tal-ħut ta' 5 %).

— Dejta f'tabella tal-piż (u t-tul) tal-ħut, b'rabta mal-konċentrazzjonijiet kimiċi tal-ħut individwali (u l-kontenut lipidu, jekk applikabbli), kemm għall-gruppi tal-kontroll u tal-esponiment (pereżempju bl-użu ta' identifikaturi uniċi għal kull ħuta fil-kampjun) u kalkoli għall-kostant(i) tar-rata ta' tkabbir derivat.

▼M7

— Dejta f'tabella tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut (C_f, marbuta mal-ħut individwali) u l-ilma (C_w) (bil-valuri medji għall-grupp tat-test u l-kontroll, id-devjazzjoni standard u l-medda, jekk xierqa) għall-ħinijiet tal-kampjunar kollha (C_f espressa f'mg/kg piż niedi tal-ġisem sħiħ jew tessuti speċifikati fih, eż. lipid, u C_w f'mg/l). Valuri tas-C_w għas-serje tal-kontroll (l-isfond għandu jiġi rrapportat ukoll).

— Il-kurvi (inkluża d-dejta mkejla kollha), li juru dan li ġej (jekk applikabbli, il-konċentrazzjonijiet jistgħu jiġu espressi b'rabta mal-ġisem sħiħ u l-kontenut lipidu normalizzat għal 5 % tal-annimal jew tessuti speċifiċi tiegħu):

  — it-tkabbir, jiġifieri l-piż tal-ħut vs il-ħin jew il-piż trasformat tal-logaritma naturali vs il-ħin (inkluż il-kostant tar-rata ta' tkabbir derivata, k_g);

  — it-teħid u t-tisfija tas-sustanza tat-test fil-ħut (fi graff wieħed);

  — il-ħin għall-istat stazzjonarju (jekk jinkiseb);

  — il-konċentrazzjoni trasformata tal-logaritma naturali vs il-ħin tat-teħid (inkluż il-kostant tar-rata ta' teħid derivat k_1);

  — il-konċentrazzjoni trasformata tal-logaritma naturali (f'konċentrazzjoni) vs il-ħin tat-tisfija (inkluż il-kostant tar-rata ta' tisfija derivat k_2); u

  — il-kurvi tal-fażi ta' teħid kif ukoll ta' tisfija, li juru kemm id-dejta kif ukoll il-mudell iffittjat.

— Jekk spezzjoni viżiva ta' plott turi eċċezzjonijiet ovvji, jista' jiġi applikat test tal-eċċezzjonijiet statistikament validu sabiex jitneħħew punti ta' dejta spurji kif ukoll tingħata ġustifikazzjoni dokumentata għaliex tneħħew.

— Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}), jekk (kważi) jinkiseb stat stazzjonarju.

— Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) u l-kostanti tar-rata ta' tisfija u teħid derivati k_1 u k_2, flimkien mal-varjanzi f'k_2 (pendil u interċetta) jekk jintuża ffittjar sekwenzjali.

— Il-limiti tal-kunfidenza, id-devjazzjoni standard (kif disponibbli) u l-metodi ta' kalkolu/analiżi tad-dejta għal kull parametru għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test użata.

  — Kwalunkwe informazzjoni li tikkonċerna metaboliti radjotikkettati tas-sustanza tat-test u l-akkumulazzjoni tagħhom.

  — Il-kostant(i) tar-rata ta' tkabbir (inkluż l-intervall(i) ta' kunfidenza ta' 95 %) u l-valuri tal-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir ikkalkolat (k_{2g}), tan-nofs ħajja u tal-BCF (BCF_{Kg}).

  — Kwalunkwe ħaġa li mhijiex tas-soltu dwar it-test, kwalunkwe devjazzjoni minn dawn il-proċeduri, u kwalunkwe informazzjoni rilevanti oħra.

  — Tabella li tiġbor id-dejta mkejla u kkalkolata rilevanti, kif spjegat hawn:

▼M7

Il-Kostanti tar-Rata ta' Teħid u Tisfija tas-Sustanza u l-Fatturi ta' Bijokonċentrazzjoni (BCF)	
k_g (kostant tar-rata ta' tkabbir; jum^{-1}):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
k_1 (kostant totali tar-rata ta' teħid; $l\ kg^{-1}\ jum^{-1}$):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
k_2 (kostant totali tar-rata tat-tisfija; jum^{-1}):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
k_{2g} (kostant tar-rata ta' tisfija korrett għat-tkabbir; jum^{-1}):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
C_f (konċentrazzjoni kimika fil-ħut fi stat stazzjoanrju; $mg\ kg^{-1}$):	Daħħal Valur ± SD (2)
C_w (konċentrazzjoni kimika fl-ilma; $mg\ l^{-1}$):	Daħħal Valur ± SD (2)
L_n (fattur ta' normalizzazzjoni għal-lipidu):	Daħħal Valur (3)
BCF_{SS} (BCF fi stat stazzjonarju; $l\ kg^{-1}$)	Daħħal Valur ± SD (2)
BCF_{SSL} BCF fi stat stazzjonarju normalizzat għal-lipidu; $l\ kg^{-1}$):	Daħħal Valur (3) ± SD (2)
BCF_K (BCF kinetiku; $l\ kg^{-1}$)	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (BCF kinetiku kkoreġut għat-tkabbir; $l\ kg^{-1}$)	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
$t_{1/2g}$ (nofs ħajja kkoreġuta għat-tkabbir; jum):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (BCF kinetiku normalizzat għal-lipidu; $l\ kg^{-1}$):	Daħħal Valur
BCF_{KL} (BCF kinetiku kkoreġut għat-tkabbir normalizzat għal-lipidu; $l\ kg^{-1}$):	Daħħal Valur

(1) CI: intervall ta' kunfidenza (fejn ikun possibbli li jiġi stmat)
(2) SD: Devjazzjoni standard (fejn ikun possibbli li tiġi stmata)

Ir-riżultati rrapportati bħala "mhux identifikati/ikkwalifikati fil-limitu ta' detezzjoni/kwantifikazzjoni" bi żvilupp ta' metodu ta' qabel l-ittestjar u disinn sperimentali għandhom jiġu evitati, peress li dawn ir-riżultati ma jistgħux jintużaw għal kalkoli tal-kostanti tar-rati.

C.13 — II **TEST TAL-ĦUT TAL-ESPONIMENT MILWIEM MINIMIZZAT**

INTRODUZZJONI

L-esperjenza dejjem ikbar li nkisbet fit-twettiq u l-interpretazzjoni tat-test sħiħ, kemm mil-laboratorji kif ukoll mill-korpi regolatorji, turi li — bi ftit eċċezzjonijiet — il-kinetika tal-ewwel ordni tapplika għall-istima tal-kostanti tar-rati ta' teħid u tisfija. B'hekk, il-kostanti tar-rata ta' teħid u tisfija jistgħu jiġu stmati b'minimu ta' punti tal-kampjunar, u l-BCF kinetiku derivat.

L-iskop inizjali tal-eżaminazzjoni ta' disinni alternattivi għall-istudji tal-BCF kien li jiġi żviluppat test żgħir li jintuża fi stadju ta' ttestjar intermedju jew li jiġu kkonfermati l-istimi tal-BCF fuq il-bażi tal-K_{OW} u l-QSARs u sabiex tiġi eliminata l-ħtieġa ta' studju sħiħ għal ħafna sustanzi, u sabiex jiġu minimizzati l-kost u l-użu ta' annimali bit-tnaqqis fil-kampjunar u fin-numru ta' sekwenzi analitiċi

▼M7

mwettqin. Filwaqt li jiġi segwit id-disinn ewlieni tal-metodu ta' ttestjar preċedenti sabiex ikunu jistgħu jiġu intergrati r-riżultati tat-test mad-dejta tal-BCF eżistenti, u sabiex jitħaffu t-twettiq tal-ittestjar u l-interpretazzjoni tad-dejta, l-iskop kien li jiġu pprovduti stimi tal-BCF b'reqqa u preċiżjoni adegwati għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjoni tar-riskju. Ħafna mill-istess kunsiderazzjonijiet japplikaw bħal fit-test sħiħ, eż. kriterji tal-validità (ara l-paragrafu 24) u l-waqfien ta' test jekk jidher teħid inisinifikanti fi tmiem il-fażi ta' teħid (ara l-paragrafi 16 u 38).

Is-sustanzi li jkunu eliġibbli għad-disinn tat-test minimizzat għandhom jappartjenu għad-dominju ġenerali li għalih ġie żviluppat dan il-metodu ta' ttestjar, jiġifieri sustanzi organiċi mhux polari (ara l-paragrafu 49). Jekk hemm xi indikazzjoni li s-sustanza li sejra tiġi ttestjata tista' turi mġiba differenti (eż. devjazzjoni ċara mill-kinetika tal-ewwel ordni), għandu jsir test sħiħ għal finijiet regolatorji.

Tipikament, it-test minimizzat ma jsirx tul perjodu iqsar mit-test tal-BCF standard, iżda jinvolvi inqas kampjunar tal-ħut (ara l-Appendiċi 6 għar-raġuni). Madankollu, il-perjodu ta' tisfija jista' jitqassar għal sustanzi li jissaffew malajr sabiex jiġi evitat milli l-konċentrazzjonijiet fil-ħut jaqgħu taħt il-limitu ta' detezzjoni/kwantifikazzjoni qabel ma jintemm it-test. Jista' jintuża test tal-ħut b'esponiment minimizzat b'konċentrazzjoni waħda sabiex tiġi stabbilita l-ħtieġa ta' test sħiħ, u jekk id-dejta li tirriżulta użata sabiex jiġu kkalkolati l-kostanti tar-rati u l-BCF tkun robusta (ara l-paragrafu 93), it-test sħiħ jista' jiġi evitat jekk il-BCF li jirriżulta ma jkun xejn qrib il-valuri regolatorji ta' tħassib.

F'ċerti każijiet, jista' jkun ta' vantaġġ li jsir id-disinn tat-test minimizzat b'iktar minn konċentrazzjoni tat-test waħda bħala test preliminari sabiex jiġi stabbilit jekk l-istimi tal-BCF għal sustanza humiex dipendenti mill-konċentrazzjoni. Jekk l-istimi tal-BCF mit-test minimizzat juru dipendenza mill-konċentrazzjoni, bilfors ikollu jitwettaq it-test sħiħ. Jekk, fuq il-bażi ta' test minimizzat bħal dan, l-istimi tal-BCF ma jkunux dipendenti mill-konċentrazzjoni iżda r-riżultati ma jitqisux definittivi, kwlunkwe test sħiħ sussegwenti jista' jsir b'konċentrazzjoni waħda, u b'hekk jonqos l-użu ta' annimali meta mqabbel ma' test sħiħ b'żewġ konċentrazzjonijiet (jew iktar).

Sustanzi potenzjalment eliġibbli għat-test minimizzat:

— Għandu jkollhom probabilità li jesibixxu teħid tal-ewwel ordni approssimattiv u kinetika ta' tisfija, eż. derivati minn read-across b'sustanzi simili;

— Għandu jkollhom log K_{OW} < 6 sakemm ma jkunx mistenni metaboliżmu rapidu ([1]);

— Għandhom ikunu solubbli fl-ilma fir-rigward tat-teknika analitika (ara l-paragrafu 24);

— Għandhom ikunu kwantifikabbli (jiġifieri l-konċentrazzjonijiet għandhom ikunu tal-inqas ordni ta' kobor ikbar mil-limitu ta' kwantifikazzjoni), kemm fil-ħut kif ukoll fl-ilma, it-tikkettar radjuattiv huwa rakkomandat (ara l-paragrafu 23); u

— Għandu jkollhom perjodu ta' tisfija ikbar min-nofs ħajja prevista tagħhom (ara l-Appendiċi 5 għall-kalkoli), jew id-durata tat-tisfija għandha tiġi aġġustata kif xieraq (ara l-paragrafu 91). Eċċezzjoni għal din ir-regola hija permessa jekk ikun mistenni metaboliżmu rapidu tas-sustanza.

([1]) Fil-fatt it-test minimizzat jista' jintuża sabiex jintwera metaboliżmu rapidu meta jkun magħruf li hemm probabilità ta' metaboliżmu rapidu.

▼M7

SKEDA TAL-KAMPJUNAR GĦAL STUDJI SKONT ID-DISINN MINIMIZZAT

Kampjunar tal-Ħut

Il-kampjunar tal-ħut jitnaqqas għal erba' punti tal-kampjunar:

— Fin-nofs u fi tmiem il-fażi ta' teħid (din tal-aħħar li hija l-bidu tat-tisfija wkoll), eż. wara 14 u 28 jum (33).

— F'nofs il-fażi ta' tisfija u fi tmiem l-istudju (meta l-konċentrazzjoni tas-sustanza tkun < 10 % tal-konċentrazzjoni massima, jew tal-inqas biċ-ċar oltre nofs ħajja waħda tas-sustanza), eż. wara 7 u 14-il jum ta' tisfija (33). Jekk tkun mistennija jew osservata tisfija rapida, jista' jkun hemm bżonn li jitqassar il-perjodu ta' tisfija sabiex jiġi evitat milli l-konċentrazzjonijiet fil-ħut jaqgħu taħt il-limitu ta' kwantifikazzjoni.

— Kejl tal-lipidu bħal fl-istudju sħiħ.

— Korrezzjoni tat-tkabbir bħal fl-istudju sħiħ.

— Il-BCF huwa kkalkolat bħala BCF kinetiku.

Kampjunar tal-ilma

Għad-disinn minimizzat, l-ilma jiġi kampjunat bħal fl-istudju sħiħ (ara l-paragrafu 54) jew tal-inqas ħames darbiet maqsumin bl-eżatt matul il-fażi ta' teħid, u kull ġimgħa fil-fażi ta' tisfija.

Modifiki fid-disinn

Fid-dawl tal-proprjetajiet tas-sustanza tat-test, previżjonijiet validi tal-QSAR u l-iskop speċifiku tal-istudju, jistgħu jiġu kkunsidrati ċerti modifiki fid-disinn tal-istudju:

— Jekk ikun hemm bżonn ta' perċezzjoni ikbar, jista' jintuża iktar ħut (6 jew 8 minflok 4) għall-kampjun fi tmiem il-fażi ta' teħid.

— L-inklużjoni ta' grupp "żejjed" ta' ħut li sejjer jintuża jekk it-tisfija wara 14-il jum (jew it-tmiem imbassar tal-fażi ta' tisfija) ma tkunx biżżejjed għal tisfija adegwata (jiġifieri > 50 %). Jekk id-durata mbassra tal-fażi ta' tisfija tkun iqsar jew itwal minn 14-il jum, l-iskeda ta' kampjunar għandha tiġi adattata (jiġifieri grupp tal-ħut wieħed fit-tmiem imbassar tal-fażi ta' tisfija, u grupp wieħed wara nofs dak iż-żmien).

— L-użu ta' żewġ konċentrazzjonijiet tat-test sabiex tiġi esplorata d-dipendenza possibbli mill-konċentrazzjoni. Jekk ir-riżultati tat-test minimizzat, imwettaq b'żewġ konċentrazzjonijiet tat-test, juru li l-BCF mhuwiex dipendenti mill-konċentrazzjoni (jiġifieri jvarja inqas minn 20 %), konċentrazzjoni tat-test waħda tista' tiġi kkunsidrata biżżejjed f'test sħiħ, jekk isir.

— Jidher probabbli li l-mudelli tal-proċessi ta' bijoakkumulazzjoni bħal dawk proposti minn Arnot *et al.* (35) jistgħu jintużaw sabiex jgħinu fl-ippjanar tat-tul tal-fażijiet ta' teħid u tisfija (ara wkoll l-Appendiċi 5).

Kalkoli

Ir-raġuni wara dan l-approċċ hija li l-fattur ta' bijokonċentrazzjoni f'test sħiħ jista' jew jiġi stabbilit bħala fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) billi jiġi kkalkolat il-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-tessut tal-ħut għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma, jew billi jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) bħala l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' teħid k_1 għall-kostant tar-rata ta' tisfija k_2. Il-BCF_K huwa validu anki jekk

▼M7

ma tintlaħaqx konċentrazzjoni fi stat fiss ta' sustanza matul it-teħid, diment li t-teħid u t-tisfija jaġixxu bejn wieħed u ieħor skont il-proċessi tal-kinetika tal-ewwel ordni. Bħala minimu assolut, huma meħtieġa żewġ punti ta' dejta sabiex jiġu stmati l-kostanti tar-rati ta' teħid u tisfija, wieħed fi tmiem il-fażi ta' teħid (jiġifieri fil-bidu tal-fażi ta' tisfija) u wieħed fi tmiem il-fażi ta' tisfija (jew wara parti sinifikanti tagħha). Il-punt ta' kampjunar intermedju huwa rakkomandat bħala verifika fuq il-kinetika tat-teħid u t-tisfija [1]. Għall-kalkoli, ara l-Appendiċijiet 5 u 6.

Interpretazzjoni tar-riżultati

Sabiex jiġu vvalutati l-validità u l-valur informattiv tat-test, ivverifika li l-perjodu ta' tisfija jaqbeż nofs ħajja waħda. Barra minn hekk, il-BCF_{Km} (BCF kinetiku derivat minn test minimizzat) għandu jitqabbel mal-valur tal-BCF_{SS} minimizzat (li huwa l-BCF_{SS} ikkalkolat fi tmiem il-fażi ta' teħid, jekk jiġi supponut li ntlaħaq stat stazzjonarju. Dan jista' jiġi supponut biss, għaliex in-numru ta' punti ta' kampjunar mhuwiex biżżejjed sabiex tingħata prova ta' dan). Jekk il-BCF_{Km} < BCF_{SS} minimizzat, il-BCF_{SS} minimizzat għandu jkun il-valur ippreferut. Jekk il-BCF_{Km} ikun inqas minn 70 % tal-BCF_{SS} minimizzat, ir-riżultati mhumiex validi, u għandu jsir test sħiħ.

Jekk it-test minimizzat jagħti BCF_{Km} ta' madwar kwalunkwe valur ta' tħassib regolatorju, għandu jsir test sħiħ. Jekk ir-riżultat ma jkun qrib ebda valur regolatorju ta' tħassib (ferm ogħla jew inqas), jaf ma jkunx hemm bżonn li jsir test sħiħ, jew jista' jsir test sħiħ b'konċentrazzjoni waħda jekk dan ikun meħtieġ mill-qafas regolatorju rilevanti.

Jekk jinstab li test sħiħ huwa neċessarju wara test minimizzat f'konċentrazzjoni waħda, dan jista' jsir bit-tieni konċentrazzjoni. Jekk ir-riżultati jkunu konsistenti, jista' ma jsirx test ieħor sħiħ f'konċentrazzjoni differenti, peress li l-bijokonċentrazzjoni tas-sustanza ma tkunx mistennija li tkun dipendenti mill-konċentrazzjoni. Jekk it-test minimizzat sar f'żewġ konċentrazzjonijiet, u r-riżultati ma juru ebda dipendenza mill-konċentrazzjoni, it-test sħiħ jista' jsir b'konċentrazzjoni waħda biss (ara l-paragrafu 87).

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għat-test minimizzat għandu jinkludi l-informazzjoni kollha mitluba għat-test sħiħ (ara l-paragrafu 81), ħlief dik li ma tistax tiġi elaborata (jiġifieri kurva li turi l-ħin għall-istat stazzjonarju u l-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju; għal dan tal-aħħar, minflok għandu jingħata l-BCF_{ss} minimizzat). Barra minn hekk, għandu jinkludi wkoll ir-raġuni għall-użu tat-test minimizzat u l-BCF_{Km} li jirriżulta.

C.13 — III **TEST TAL-BIJOAKKUMULAZZJONI B'ESPONIMENT DJETETIKU FIL-ĦUT**

INTRODUZZJONI

Il-metodu deskritt f'din is-sezzjoni għandu jintuża għal sustanzi li fihom il-metodoloġija ta' esponiment milwiem ma tkunx prattikabbli (pereżempju għaliex ma jitsgħux jinżammu konċentrazzjonijiet stabbli u li jistgħu jitkejlu fl-ilma, jew inkella ma jistgħux jinkisbu preżenzi adegwati fil-ġisem fi żmien 60 jum mill-esponiment; ara s-sezzjonijiet preċedenti fuq il-metodu ta' esponiment milwiem). Iżda ta' min jagħraf li l-punt ta' tmiem minn dan it-test sejjer ikun fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetiku (BMF) minflok fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF) [2].

F'Mejju 2001, fil-konferenza ta' SETAC Europe li saret f'Madrid (36) ġie ppreżentat metodu ġdid għall-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi organiċi ftit li xejn solubbli fl-ilma. Dan bena fuq bosta studji tal-bijoakkumulazzjoni rrapportati fit-tagħrif bl-użu ta' metodu tad-dożaġġ li kien jinvolvi għalf miżjud (eż. (37)). Kmieni fl-2004, abbozz ta' protokoll (38), imfassal sabiex ikejjel il-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi organiċi ftit li xejn solubbli fl-ilma li għalihom il-metodu ta' bijokonċentrazzjoni standard ta' esponiment fl-ilma ma

[1] Meta jitkejlu żewġ punti ta' dejta biss, l-istimi tal-limiti ta' kunfidenza għall-BCF_{Km} jistgħu jsiru bl-użu ta' metodi bootstrap. Meta jkun hemm anki punti ta' dejta intermedji disponibbli, il-limiti ta' kunfidenza għall-BCF_{Km} jistgħu jiġu kkalkolati bħal fit-test sħiħ.

[2] Ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet u unitajiet

▼M7

kienx prattikabbli, flimkien ma' dokument ta' sfond ta' sostenn (39), ġie sottomess lil grupp ta' ħidma tal-UE dwar il-PBT. Ġustifikazzjoni ulterjuri mogħtija għall-metodu kienet li l-esponiment ambjentali potenzjali għal sustanzi ftit li xejn solubbli bħal dawn (jiġifieri log K_{OW} > 5) jista' jseħħ l-iktar mad-dieta (ara (40) (41) (42) (43) (44)). Għalhekk, isir riferiment għal testijiet tal-esponiment djetetiku f'ċerti regolamenti ppubblikati dwar is-sustanzi kimiċi ([1]). Madankollu, għandu jiġi realizzat li, fil-metodu deskritt hawnhekk, l-esponiment permezz tal-fażi milwiema tiġi evitata bir-reqqa u, b'hekk, valur tal-BMF minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jitqabbel direttament ma' valur tal-BMF minn studju prattiku (li fih jistgħu jiġu kombinati l-esponiment mill-ilma kif ukoll l-esponiment djetetiku).

Din is-sezzoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar hija bbażata fuq dan il-protokoll (38) u hija metodu ġdid li ma deherx fil-verżjoni ta' qabel tat-TM C.13. Dan it-test alternattiv jippermetti sabiex il-passaġġ ta' esponiment djetetiku jiġi investigat direttament f'kundizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati.

L-investigaturi potenzjali għandhom jirreferu għall-paragrafi 1 sa 14 ta' dan il-metodu ta' ttestjar għal informazzjoni dwar meta t-test tal-esponiment djetetiku jista' jkun ippreferut fuq it-test tal-esponiment milwiem. Informazzjoni dwar il-bosta kunsiderazzjonijiet tas-sustanza tiġi stabbilita, u għandha tiġi kkunsidrata qabel ma jsir test.

L-użu ta' sustanzi tat-test radjotikkettati jista' jitqies b'kunsiderazzjonijiet simili bħall-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafi 6 u 65).

Il-metodu djetetiku jista' jintuża sabiex jiġu ttestjati iktar minn sustanza waħda f'test wieħed, diment li jkunu ssodisfati ċerti kriterji; dawn huma mistħarrġin iktar fil-paragrafu 112. Għas-sempliċità, il-metodoloġija hawnhekk tiddeskrivi test li juża sustanza waħda biss tat-test.

It-test djetetiku huwa simili għall-metodu ta' esponiment milwiem f'diversi aspetti, bl-eċċezzjoni ovvja tar-rotta ta' esponiment. B'hekk, ħafna aspetti tal-metodu deskritt hawnhekk huma l-istess bħall-metodu ta' esponiment milwiem deskritt fis-sezzjoni ta' qabel. Safejn possibbli saret kontroreferenza għall-paragrafi rilevanti fis-sezzjoni ta' qabel, iżda fl-interessi ta' leġibbiltà u fehim, ċertu ammont ta' dupplikazzjoni huwa inevitabbli.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Jistgħu jintużaw kundizzjonijiet bi fluss kontinwu jew semistatiċi (ara l-paragrafu 4); kundizzjonijiet bi fluss kontinwu huma rrakkomandati sabiex jiġi limitat l-esponiment potenzjali tas-sustanza tat-test permezz tal-ilma bħala riżultat ta' kwalunkwe desorbiment minn ikel miżjud jew rawt. It-test jikkonsisti f'żewġ fażijiet: it-teħid (għalf miżjud bis-sustanza tat-test) u tisfija (għalf nadif mhux ittrattat) (ara l-paragrafu 16). Fil-fażi ta' teħid, grupp tat-"test" ta' ħut jingħata dieta stabbilita ta' ikel kummerċjali għall-ħut b'kompożizzjoni magħrufa, miżjud bis-sustanza tat-test, kuljum. Idealment il-ħut għandu jikkonsma l-ikel kollu offrut (ara l-paragrafu 141). Imbagħad il-ħut jingħata ikel kummerċjali għall-ħut mhux ittrattat u pur matul il-fażi ta' tisfija. Bħall-metodu ta' esponiment milwiem, jekk ikun hemm bżonn jistgħu jintużaw iktar minn grupp tat-test wieħed b'konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test miżjuda differenti, iżda għall-parti l-kbira ta' sustanzi tat-test organiċi ferm idrofobiċi, grupp tat-test wieħed huwa biżżejjed (ara l-paragrafi 49 u 107). Jekk jintużaw kundizzjonijiet semistatiċi, il-ħut għandu jiġi ttrasferit f'medium ġdid u/jew kompartiment tat-test ġdid fi

([1]) Għall-fini tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH) (ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1), din il-kwistjoni hija indirizzata fil-"Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment", kapitolu R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; u l-figura R7.10-2.

▼M7

tmiem il-fażi ta' teħid (f'każ li l-medium u/jew l-apparat użat fil-fażi ta' teħid jiġi kontaminat bis-sustanza tat-test matul il-lixxivjazzjoni). Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fil-ħut jitkejlu fiż-żewġ fażijiet tat-test. Minbarra l-grupp tal-ħut mogħti d-dieta miżjuda (il-grupp tat-test), grupp tal-kontroll tal-ħut jinżamm fl-istess kundizzjonijiet u jingħata l-istess ikel ħlief li d-dieta tal-ikel kummerċjali għall-ħut ma tkunx miżjuda bis-sustanza tat-test. Dan il-grupp tal-kontroll jippermetti sabiex ikunu jistgħu jiġu kkwantifikati l-livelli ta' sfond tas-sustanza tat-test f'ħut mhux espost u jservi bħala paragun għal kwalunkwe effett avvers relatat mat-trattament osservat fil-grupp(i) tat-test ([1]). Jippermetti wkoll li jitqabblu l-kostanti tar-rati ta' tkabbir bejn il-gruppi bħala verifika li ġew ikkonsmati kwantitajiet simili tad-dieta offruta (differenzi potenzjali fil-palatabilità bejn id-dieti għandhom jiġu kkunsidrati wkoll meta jiġu spjegati l-kostanti tar-rati ta' tkabbir differenti; ara l-paragrafu 138). Importanti li matul il-fażi ta' teħid kif ukoll ta' tisfija, il-gruppi tat-test u tal-kontroll jingħataw dieti ta' ekwialenza nutrizzjonali.

Fażi ta' teħid li ddum 7-14-il jum ġeneralment tkun biżżejjed, fuq il-bażi tal-esperjenza miksuba minn dawk li żviluppaw il-metodu (38) (39). Din il-medda għandha tnaqqas il-kost tat-twettiq tat-test filwaqt li tiżgura biżżejjed esponiment għal ħafna mis-sustanzi. Madankollu, f'ċerti każijiet, il-fażi ta' teħid tista' tiġi estiża (ara l-paragrafu 127). Matul il-fażi ta' teħid, il-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-ħut jaf ma tilħaqx stat stazzjonarju, u b'hekk id-dejta dwar it-trattament u r-riżultati minn dan il-metodu normalment ikunu bbażati fuq analiżi kinetika tar-residwi tat-tessut. (Nota: L-ekwazzjonijiet għall-istima taż-żmien għall-istat stazzjonarju jistgħu jiġu applikati hawnhekk bħal fil-każ tat-test tal-esponiment milwiem — ara l-Appendiċi 5). Il-fażi ta' tisfija tibda meta l-ħut l-ewwel jingħata dieta mhux miżjuda u tipikament iddum sa 28 jum jew sakemm is-sustanza tat-test ma tkunx tista' tibqa' tiġi kkwantifikata fil-ħut sħiħ, skont liema jiġi l-ewwel. Il-fażi ta' tisfija tista' titqassar jew tittawwal iktar minn 28 jum, skont il-bidla biż-żmien fil-konċentrazzjonijiet kimiċi mkejlin u d-daqs tal-ħut.

Dan il-metodu jippermettu li tiġi stabbilita n-nofs ħajja speċifika għas-sustanza ($t_{1/2}$, mill-kostant tar-rata ta' tisfija, k_2), l-effiċjenza ta' assimilazzjoni (l-assorbiment fl-imsaren; *a*), il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika kinetika (BMF_K), il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika kinetika kkoreġut għat-tkabbir (BMF_{Kg}), u l-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika kinetika kkoreġut għal-lipidu ([2]) (BMF_{KL}) (u/jew il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika kinetika kkoreġut għat-tkabbir u l-lipidu, BMF_{KgL}) għas-sustanza tat-test fil-ħut. Bħal fil-metodu ta' esponiment milwiem, żieda fil-massa tal-ħut matul it-test sejra tirriżulta f'dilwizzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut li qiegħed jikber u, b'hekk, il-BMF kinetiku sejjer jiġi sottovalutat jekk ma jiġix ikkoreġut għat-tkabbir (ara l-paragrafi 162 u 163). Barra minn hekk, jekk jiġi stmat li l-istat stazzjonarju ntlaħaq fil-fażi ta' teħid, jista' jiġi kkalkolat BMF indikattiv fi stat stazzjonarju. Hemm approċċi disponibbli li jagħmluha possibbli li jiġi stmat fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) minn dejta ġġenerata fl-istudju djetetiku (ez. .(44) (45) (46) (47) (48)). Il-vantaġġi u l-iżvantaġġi tat-tali approċċi huma diskussi fl-Appendiċi 8.

([1]) Għal ħafna mis-sustanzi tat-test, idealment ma għandu jkun hemm ebda individwazzjoni fl-ilma tal-kontroll. Il-konċentrazzjonijiet ta' sfond għandhom ikun rilevanti biss għal materjali li jseħħu naturalment (eż. ċerti metalli) u sustanzi li ssibhom faċilment fl-ambjent.

([2]) Peress li l-BMF huwa definit bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjoni ta' sustanza f'organiżmu għal dik fl-ikel tal-organiżmu fi stat stazzjonarju, il-lipidu jiġi kkunsidrat billi ssir korrezzjoni għall-kontenuti ta' lipidu fl-organiżmu u fl-ikel, u b'hekk jiġi deskritt b'mod iktar preċiż bħala "korrezzjoni". Dan l-approċċ ivarja min-"normalizzazzjoni" sabiex jiġi stabbilit kontenut lipidu ta' organiżmu kif isir fit-test tal-bijokonċentrazzjoni tal-esponiment milwiem.

▼M7

It-test tfassal primarjament għal sustanzi organiċi mhux polari ftit li xejn solubbli li jsegwu kinetika ta' teħid u tisfija ta' bejn wieħed u ieħor l-ewwel ordni fil-ħut. F'każ li tiġi ttestjata sustanza li ma ssegwix kinetika ta' teħid u tisfija ta' bejn wieħed u ieħor l-ewwel ordni, għandhom jintużaw mudelli iktar kumplessi (ara r-referenzi fl-Appendiċi 5) u għandu jitfittex parir minn espert tal-bijostatistika u/jew tal-farmakokinetika.

Normalment il-BMF jiġi stabbilit bl-użu ta' analiżi tas-sustanza tat-test tal-ħuta sħiħa (bażi tal-piż niedi). Jekk rilevanti għall-objettivi tal-istudju, tessuti speċifiċi (eż. muskolu, fwied) jistgħu jiġu kampjunati jekk il-ħut jinqasam f'partijiet li jittieklu u li ma jittiklux (ara l-paragrafu 21). Barra minn hekk, jistgħu jsiru tneħħija u analiżi separata tal-apparat gastrointestinali sabiex tiġi stabbilita l-kontribuzzjoni għall-konċentrazzjonijiet tal-ħut sħiħ għal punti tal-kampjun fi tmiem il-fażi ta' teħid u qrib il-bidu tal-fażi ta' tisfija, jew bħala parti minn approċċ ta' bilanċ tal-massa.

Għandu jitkejjel il-kontenut lipidu ta' ħut sħiħ kampjunat sabiex il-konċentrazzjonijiet ikunu jistgħu jiġu kkoreġuti għal-lipidu, filwaqt li jitqies il-kontenut lipidu tad-dieta kif ukoll tal-ħut (ara l-paragrafi 56 u 57, u l-Appendiċi 7).

Il-piż tal-ħut ta' individwi fil-kampjun għandu jitkejjel u jiġi rreġistrat, u jkun marbut mal-konċentrazzjoni kimika analizzata għal dak l-individwu (eż. irrapportat bl-użu ta' kodiċi identifikatur uniku għal kull ħuta kampjunata), għall-fini ta' kalkolu tat-tkabbir li jista' jseħħ matul it-test. It-tul totali tal-ħut għandu jitkejjel ukoll, meta possibbli ([1]). Id-dejta dwar il-piż hija meħtieġa wkoll sabiex jiġi stmat il-BCF bl-użu ta' dejta dwar it-tisfija mit-test djetetiku.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Għandu jkun hemm għad-dispożizzjoni informazzjoni dwar is-sustanza tat-test kif deskritta fil-paragrafi 3 u 22. Normalment ma jkunx hemm bżonn li jsir metodu analitiku għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fl-ilma; huma meħtieġa metodi b'sensittività xierqa għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet fl-ikel tal-ħut u t-tessut tal-ħut.

Il-metodu jista' jintuża sabiex jiġu ttestjati iktar minn sustanza waħda f'test wieħed. Madankollu, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu kompatibbli ma' xulxin sabiex ma jinteraġixxux u lanqas ma jibdlu l-identità kimika tagħhom malli jiżdiedu fl-ikel tat-test. L-għan huwa li r-riżultati mkejlin għal kull sustanza ttestjata flimkien ma jvarjawx ħafna mir-riżultati li jinkisbu li kieku t-testijiet individwali saru fuq kull sustanza tat-test. Il-ħidma analitika preliminari għandha tistabbilixxi li kull sustanza tista' tiġi rkuprata minn kampjun tal-ikel miżjud b'mod multiplu u tessut tal-ħut bi i) rkupru għoljin (eż. > 85 % tan-nominal) u ii) is-sensittività neċessarja għall-ittestjar. Id-doża totali tas-sustanzi ttestjati flimkien għandha tkun inqas mill-konċentrazzjoni kombinata li tista' tikkaġuna effetti tossiċi (ara l-paragrafu 51). Barra minn hekk, effetti avversi possibbli fil-ħut u l-potenzjal għal effetti interattivi (eż. effetti metaboliċi) assoċjati mal-ittestjar ta' bosta sustanzi fl-istess ħin għandhom jittieħdu f'kunsiderazzjoni fid-disinn sperimentali. Għandu jiġi evitat milli jiġu ttestjati sustanzi jonizzabbli fl-istess ħin. F'termini tal-esponiment, il-metodu huwa xieraq ukoll għal taħlitiet kumplessi (ara l-paragrafu 13, għad li sejrin japplikaw l-istess limitazzjonijiet fl-analiżi bħal għal kwalunkwe metodu ieħor).

VALIDITÀ TAT-TEST

Sabiex test ikun validu, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin (ara l-paragrafu 24):

— Il-varjazzjoni fit-temperatura hija inqas minn ± 2 °C fil-gruppi tat-trattament jew tal-kontroll.

([1]) It-tul totali għandu jiġi rreġistrat ukoll matul it-test peress li huwa indikatur tajjeb ta' jekk seħħx effett avvers.

▼M7

— Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt ma taqax taħt is-60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja

— Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel tal-ħut qabel u fi tmiem il-fażi ta' teħid taqa' fi ħdan medda ta' ± 20 % (fuq il-bażi ta' tal-inqas tliet kampjuni fiż-żewġ punti ta' żmien)

— Għandu jintwera grad għoli ta' omoġenità tas-sustanza fl-ikel fil-ħidma analitika preliminari fid-dieta miżjuda; tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tal-kampjun għas-sustanza meħuda fil-bidu tat-test ma għandhomx ivarjaw b'iktar minn ± 15 % mill-medja

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mhumiex individwati, jew huma preżenti biss f'livelli ta' traċċi tipiċi, f'ikel mhux miżjud jew tessuti tal-ħut tal-kontroll relatati mal-kampjuni ttrattati

— Il-mortalità jew effetti avversi oħrajn/mard kemm fil-ħut tal-grupp tal-kontroll kif ukoll dak tal-grupp tat-test għandhom ikunu ≤ 10 % fi tmiem it-test; jekk it-test jiġi estiż għal xi raġuni, l-effetti avversi fiż-żewġ gruppi għandhom ikunu ≤ 5 % fix-xahar, u ≤ 30 % b'mod kumulattiv. Differenzi sinifikanti fit-tkabbir medju bejn il-gruppi tat-test u tal-kontroll tal-ħut kampjunat jistgħu jkunu indikazzjoni ta' effett tossiku tas-sustanza tat-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

Jekk laboratorju ma jkunx għamel l-assaġġ qabel jew jekk ikunu saru bidliet sostanzjali (eż. bidla fir-razza tal-ħut jew tal-fornitur, speċi tal-ħut differenti, bidla sinifikanti fid-daqs tal-ħut, l-ikel tal-ħut jew il-metodu ta' żieda tas-sustanza, eċċ.) huwa rrakkomandat li jsir studju tal-profiċjenza teknika, bl-użu ta' sustanza ta' referenza. Is-sustanza ta' referenza tintuża primarjament sabiex jiġi stabbilit jekk it-teknika ta' żieda tas-sustanza mal-ikel hijiex adegwata sabiex jiġu żgurati omoġenità u bijodisponibilità massimi tas-sustanzi tat-test. Eżempju minnhom li ntuża fil-każ ta' sustanzi idrofobiċi mhux polari huwa l-essaklorobenżen (HCB), iżda għandhom jiġu kkunsidrati sustanzi oħrajn b'dejta affidabbli eżistenti dwar it-teħid u l-bijomanjifikazzjoni minħabba l-proprjetà dannuża tal-HCB ([1]). Jekk tintuża, fir-rapport tat-test għandha tiġi ppreżentata informazzjoni bażika dwar is-sustanza ta' referenza, inkluż l-isem, il-purità, in-numru CAS, l-istruttura, id-dejta dwar it-tossiċità (jekk disponibbli) bħal fil-każ tas-sustanzi tat-test (ara l-paragrafi 3 u 22).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

Il-materjali u l-apparat għandhom jintużaw kif deskritt fil-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafu 26). Għandha tintuża sistema tat-test tat-tiġdid bi fluss kontinwu jew statiku li tipprovdi volum biżżejjed ta' ilma ta' dilwizzjoni għat-tankijiet tat-test. Ir-rati tal-fluss għandhom jiġu rreġistrati

Ilma

L-ilma tat-test għandu jintuża kif deskritt fil-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafi 27-29). Il-medium tat-test għandu jkun ikkaratterizzat kif spjegat u l-kwalità tiegħu għandha tibqa' konsistenti matul it-test. Il-kontenut ta' partiċelli naturali u l-karbonju organiku totali għandhom ikunu baxxi kemm jista' jkun (≤ 5 mg/l materja partikolata; ≤ 2 mg/l karbonju organiku totali) qabel ma jibda t-test. It-TOC trid titkejjel biss qabel it-test bħala parti mill-karatterizzazzjoni tal-ilma tat-test (ara l-paragrafu 53).

([1]) HCB huwa elenkat fl-Annessi A u C għall-Konvenzjoni ta' Stokkolma, u fl-Annessi I u III tar-Regolament (KE) Nru 850/2004 dwar pollutanti organiċi persistenti (ĠU L 158, 30.4.2004, p. 7)

▼M7

Dieta

Huwa rakkomandat ikel kummerċjalment disponibbli għall-ħut (dieta f'gerbub li jżomm fil-wiċċ u/jew li jegħreq bil-mod) li huwa kkaratterizzat f'termini ta' tal-inqas kontenut ta' proteina u ta' xaħam. L-ikel għandu jkollu qies uniformi tal-gerbub sabiex tiżdied l-effiċjenza tal-esponiment tal-għalf, jiġifieri l-ħut sejjer jiekol iktar ikel minflok ma jiekol il-biċċiet il-kbar u jitlef iż-żgħar. Il-gerbub għandu jkun ta' qies xieraq għad-daqs tal-ħuta fil-bidu tat-test (eż. jistgħu jintużaw dijametri tal-gerbub ta' madwar 0.6-0.85 mm għal ħut ta' tul totali ta' bejn 3 u 7 cm, u 0.85-1.2 mm għal ħut ta' tul totali ta' bejn 6 u 12-il cm). Id-daqs tal-gerbub jista' jiġi rranġat skont kemm jikber il-ħut fil-bidu tal-fażi ta' tisfija. Eżempju ta' kompożizzjoni xierqa tal-ikel, kif fornit kummerċjalment, jingħata fl-Appendiċi 7. Id-dieti tat-test b'kontenut lipidu totali ta' bejn 15 u 20 % (w/w) intużaw ta' spiss fl-iżvilupp ta' dan il-metodu. Ikel tal-ħut b'konċentrazzjoni lipida tant għolja jaf ma jkunx disponibbli f'ċerti reġjuni. F'dawn il-każijiet, jistgħu jsiru studju b'konċentrazzjoni lipida inqas fl-ikel u, jekk ikun hemm bżonn, ir-rata tal-għalf tiġi aġġustata kif xieraq sabiex tinżamm is-saħħa tal-ħut (fuq il-bażi tal-ittestjar preliminari). Il-kontenut lipidu totali tad-dieti tal-grupp tat-test u tal-grupp tal-kontroll irid jitkejjel u jiġi rreġistrat qabel ma jibda t-test u fi tmiem il-fażi ta' teħid. Id-dettalji pprovduti mill-fornitur tal-għalf kummerċjali tal-analiżi għal nutrijenti, umditá, fibra u rmied u, jekk possibbli, minerali u residwi ta' pestiċidi (eż. sustanzi niġġiesa "standard" ta' prijoritá), għandhom jiġu ppreżentati fir-rapport tal-istudju.

Meta l-ikel jiġi miżjud bis-sustanza tat-test, għandhom isiru l-isforzi kollha possibbli sabiex tiġi żgurata omoġenità fl-ikel tat-test. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel għall-grupp tat-test għandha tingħażel filwaqt li titqies is-sensittività tat-teknika analitika, it-tossiċità tas-sustanza tat-test (NOEC, jekk magħrufa) u d-dejta fiżikokimika rilevanti. Jekk tintuża, idealment is-sustanza ta' referenza għandha tiġi inkorporata f'konċentrazzjoni ta' madwar 10 % ta' dik tas-sustanza tat-test (jew fi kwalunkwe każ fl-inqas mod prattikabbli), soġġetta għas-sensittività tal-analiżi (eż. għall-essaklorobenżen, instab li konċentrazzjoni fl-ikel ta' 1-100 µg/g hija aċċettabbli; ara (47) għal iktar informazzjoni dwar l-effiċjenzi ta' assimilazzjoni tal-HCB).

Is-sustanza tat-test tista' tiġi miżjuda mal-ikel tal-ħut b'bosta modi skont il-karatteristiċi fiżiċi u s-solubilità tagħha (ara l-Appendiċi 7 għal iktar dettalji dwar il-metodi ta' kif tiżdied is-sustanza):

— Jekk is-sustanza hija solubbli u stabbli fit-trigliċeridi, is-sustanza għandha tiġi dissolta f'ammont żgħir ta' żejt tal-ħut jew żejt veġetali li jittiekel qabel ma titħallat mal-ikel tal-ħut. F'dan il-mument, għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata l-produzzjoni ta' porzjon li jkun għoli wisq f'lipidu, filwaqt li jitqies il-kontenut lipidu naturali tal-għalf miżjud, billi tiżdied il-kwantità magħrufa minima ta' żejt meħtieġa sabiex jinkisbu distribuzzjoni u omoġenità tas-sustanza tat-test fl-ikel, jew;

— L-ikel għandu jiġi miżjud bl-użu ta' solvent organiku xieraq, diment li l-omoġenità u l-bijodisponibilità ma jitqegħdux f'riskju (huwa possibbli li jifformaw (mikro)kristalli tas-sustanza tat-test fl-ikel minħabba l-evaporazzjoni tas-solvent u ma hemm ebda mod faċli kif jintwera bil-provi li dan ma seħħx; ara. (49)), jew;

— Likwidi mhux viskuż i għandhom jiżdiedu direttament mal-ikel tal-ħut iżda għandhom ikunu mħalltin sew għall-finijiet ta' omoġenità u sabiex tiġi ffaċilitata assimilazzjoni tajba. It-teknika għat-tħallit għandha tiżgura omoġenità tal-għalf miżjud.

▼M7

Fi ftit każijiet, eż. sustanzi tat-test inqas idrofobiċi b'tendenza ikbar ta' disorbiment mill-ikel, jista' jkun ħemm bżonn li l-gerbub tal-ikel ippreparati jinksew bi kwantità żgħira ta' żejt tal-ħut/tal-qamħirrum (ara l-paragrafu 142). F'dawn il-każijiet, l-ikel tal-kontroll għandu jiġi ttrattat b'mod simili u l-għalf ippreparat finali jintuża għall-kejl tal-lipidu.

Jekk tintuża, ir-riżultati tas-sustanza ta' referenza għandhom jitqabblu mad-dejta mill-istudji tat-tagħrif imwettqin f'kundizzjonijiet simili b'rata tal-għalf komparabbli (ara l-paragrafu 45) u l-parametri speċifiċi għas-sustanza ta' referenza għandhom jissodisfaw il-kriterji rilevanti fil-paragrafu 113 (it-3^{et}, ir-4^{a} u l-5es punti).

Jekk jintuża żejt jew solvent trasportatur bħala veikolu għas-sustanza tat-test, ammont ekwivalenti tal-istess veikolu (esklużа s-sustanza tat-test) għandu jitħallat mad-dieta tal-kontroll sabiex tinżamm l-ekwivalenza mad-dieta miżjuda. Importanti li matul il-fażi ta' teħid kif ukoll ta' tisfija, il-gruppi tat-test u tal-kontroll jingħataw dieti ta' ekwivalenza nutrizzjonali.

Id-dieta miżjuda għandha tinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-istabilità tas-sustanza tat-test fi ħdan it-taħlita tal-għalf (eż. tkessiħ) u dawn il-kundizzjonijiet għandhom jiġu rrapportati.

Għażla tal-ispeċi ta' ħut

Tista' tintuża l-ispeċi ta' ħut kif speċifikati għall-esponiment milwiem (ara l-paragrafu 32 u l-Appendiċi 3). Trota qawsalla (*Oncorhynchus mykiss*), karpjun komuni (*Cyprinus carpio*) u karpjun buras (*Pimephales promelas*) intużaw ta' spiss fi studji tal-bijoakkumulazzjoni djetetika b'sustanzi organiċi qabel ma ġie pubblikat dan it-TM. L-ispeċi tat-test għandu jkollha mġiba tal-għalf li tirriżulta f'konsum rapidu tal-proprozjon tal-ikel amministrat sabiex jiġi żgurat li kwalunkwe fattur li jinfluwenza l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel (eż. lixxivjazzjoni fl-ilma u l-possibbiltà ta' esponiment milwiem) jinżamm għall-minimu. Għandu jintuża ħut fi ħdan il-medda ta' qies/piż rakkomandat (ara l-Appendiċi 3). Il-ħut ma għandux ikun żgħir wisq tant li jxekkel il-faċilità tal-analiżijiet fuq bażi individwali. Speċi tal-ħut ittestjata fi stadju tal-ħajja bi tkabbir rapidu (meta jkun għadu qed jikber) jista' jikkomplika l-interpretazzjoni tad-dejta, u rati ta' tkabbir għoljin jistgħu jinfluwenzaw il-kalkolu tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni ([1]).

Iż-żamma tal-ħut

Il-kriterji ta' akklimatizzazzjoni, mortalità u aċċettazzjoni tal-mard huma l-istess bħal tal-metodu tal-esponiment milwiem qabel it-twettiq tat-test (ara l-paragrafi 33-35).

IT-TWETTIQ TAT-TEST

Il-ħidma ta' qabel l-istudju u t-test tas-sejbien tal-medda

Hemm bżonn li ssir ħidma analitika ta' qabel l-istudju sabiex jintwera l-irkupru tas-sustanza minn ikel miżjud/tessut tal-ħut miżjud. Mhux bilfors dejjem ikun hemm bżonn li jsir test tas-sejbien tal-medda sabiex tingħażel konċentrazzjoni xierqa fl-ikel. Sabiex jintwera li ma huwa osservat ebda effett avvers u tiġi evalwata l-palatabilità tad-dieta miżjuda, is-sensittività tal-metodu analitiku

([1]) Għat-tkabbir rapidu matul il-fażi ta' teħid, ir-rata tal-għalf vera sejra tonqos f'livell taħt dik stabbilita fil-bidu tal-esponiment.

▼M7

għat-tessut tal-ħut u l-ikel, u jingħażlu rata tal-għalf u intervalli tal-kampjunar xierqa matul il-fażi ta' tisfija, eċċ., jistgħu jsiru esperimenti preliminari dwar l-għalf, iżda dawn mhumiex obbligatorji. Studju preliminari jista' jkun siewi sabiex jiġu stmati n-numri ta' ħut meħtieġa għall-kampjunar matul il-fażi ta' tisfija. Dan jista' jirriżulta fi tnaqqis sinifikanti fin-numru ta' ħut użat, speċjalment għal sustanzi tat-test li jkunu partikolarment suxxettibbli għall-metaboliżmu.

Kundizzjonijiet tal-Esponiment

Durata tal-Fażi ta' Teħid

Fażi ta' teħid ta' 7-14-il jum normalment tkun biżżejjed, li matulha grupp wieħed ta' ħut jingħata d-dieta tal-kontroll u grupp ieħor ta' ħut id-dieta tat-test kuljum b'porzjon fissa skont l-ispeċi ttestjata u l-kundizzjonijiet tal-esperiment, eż. bejn 1-2 % tal-piż tal-ġisem (piż niedi) fil-każ ta' trota qawsalla. Ir-rata tal-għalf għandha tingħażel b'tali mod li jiġu evitati tkabbir veloċi u żieda kbira fil-kontenut lipidu. Jekk ikun hemm bżonn, il-fażi ta' teħid tista' tiġi estiża fuq il-bażi tal-esperjenza prattika minn studji preċedenti jew l-għarfien dwar it-teħid/tisfija tas-sustanza tat-test (jew analogu) fil-ħut. Il-bidu tat-test huwa definit bħala l-ħin tal-ewwel għalf b'ikel miżjud. Jum sperimentali jibda mill-ħin tal-għalf sa ftit qabel il-ħin tal-għalf li jmiss (eż. siegħa). B'hekk, l-ewwel jum sperimentali tat-teħid jibda mill-ħin tal-ewwel għalf b'ikel miżjud u jintemm ftit qabel it-tieni għalf b'ikel miżjud. Fil-prattika, il-fażi ta' teħid tintemm ftit qabel (eż. siegħa) l-ewwel għalf b'sustanza tat-test mhux miżjuda filwaqt li l-ħut ikompli jiddiġerixxi l-ikel miżjud u jassorbi s-sustanza tat-test fl-24 siegħa ta' wara. Importanti li jiġi żgurat li tinkiseb preżenza fil-ġisem għolja biżżejjed (mhux tossika) tas-sustanza tat-test fir-rigward tal-metodu analitiku, sabiex tal-inqas ikun jista' jitkejjel tnaqqis ta' ordni ta' kobor matul il-fażi ta' tisfija. F'każijiet speċjali, tista' tintuża fażi ta' teħid estiża (sa 28 jum) b'kampjunar addizzjonali sabiex tinkiseb idea ta' kif taħdem il-kinetika tat-teħid. Matul it-teħid, il-konċentrazzjoni fil-ħut tista' ma tilħaqx stat stazzjonarju. L-ekwazzjonijiet għall-istima taż-żmien għall-istat stazzjonarju, bħala indikazzjoni tad-durata probabbli meħtieġa sabiex jinkisbu konċentrazzjonijiet tal-ħut sinifikanti, jistgħu jiġu applikati hawnhekk bħal fil-każ tat-test tal-esponiment milwiem (ara l-Appendiċi 5).

F'ċerti każijiet, jista' jkun magħruf li t-teħid ta' sustanza fil-ħut għal iktar minn 7-14-il jum mhuwiex sejjer ikun biżżejjed għall-konċentrazzjoni tal-ikel użata sabiex tintlaħaq konċentrazzjoni tal-ħut għolja biżżejjed sabiex tal-inqas jiġi analizzat tnaqqis ta' ordni ta' kobor matul it-tisfija, jew minħabba sensittività analitika batuta jew effiċjenza tal-assimilazzjoni baxxa. F'dawn il-każijiet, jista' jkun ta' vantaġġ li l-fażi tal-għalf inizjali tiġi estiża għal iktar minn 14-il jum, jew, speċjalment għal sustanzi ferm metabolizzabbli, għandha tiġi kkunsidrata konċentrazzjoni djetetika ogħla. Madankollu, għandha tingħata attenzjoni sabiex it-toqol tal-ġisem matul it-teħid jinżamm inqas mill-konċentrazzjoni kronika (stmata) bla effett osservat fit-tessut tal-ħut (ara l-paragrafu 138).

Durata tal-fażi ta' tisfija

It-tisfija normalment iddum 28 jum, u tibda malli l-ħut tal-grupp tat-test jingħata dieta mhux ittrattata u pura wara l-fażi ta' teħid. It-tisfija tibda bl-ewwel tagħlif ta' ikel "mhux miżjud" minflok eżatt wara l-aħħar tagħlif ta' ikel "miżjud" peress li l-ħut sejjer ikompli jiddiġerixxi l-ikel u jassorbi s-sustanza tat-test fl-24 siegħa ta' wara, kif osservat fil-paragrafu 126. B'hekk, l-ewwel kampjun fil-fażi ta' tisfija

▼M7

jittieħed ftit wara t-tieni tagħlif bid-dieta mhux miżjuda. Dan il-perjodu ta' tisfija huwa mfassal sabiex ikopri sustanzi b'nofs ħajja potenzjali li tasal sa 14-il jum, li hija konsistenti ma' dik ta' sustanzi bijoakkumulattivi ([1]), u b'ħekk 28 jum jinvolvu żewġ nofs ħajjiet ta' sustanzi bħal dawn. F'każijiet ta' sustanzi b'bijoakkumulazzjoni għolja ħafna, jista' jkun siewi li tiġi estiża l-fażi ta' tisfija (jekk indikata mill-ittestjar preliminari).

Jekk sustanza tissaffa bil-mod ħafna b'tali mod li jaf ma tiġix stabbilita nofs ħajja fil-fażi ta' tisfija, l-informazzjoni xorta waħda tista' tkun biżżejjed għal finijiet ta' valutazzjoni sabiex tindika livell għoli ta' bijoakkumulazzjoni. Għall-kuntrarju, jekk sustanza tissaffa tant malajr li ma tistax tinkiseb konċentrazzjoni żero f'ħin affidabbli (konċentrazzjoni fi tmiem it-teħid/il-bidu tat-tisfija, $C_{0,d}$) u ma jistax jinkiseb k_2, tista' ssir stima konservattiva tal-k_2 (ara l-Appendiċi 7).

Jekk l-analiżijiet tal-ħut f'intervalli bikrin (eż. 7 jew 14-il jum) juru li s-sustanza ssaffiet f'livelli inqas minn dawk ta' kwantifikazzjoni qabel il-perjodu sħiħ ta' 28 jum, il-kampjunar sussegwenti jista' jitwaqqaf u t-test jista' jiġi terminat.

Fi ftit każijiet, jista' ma jkun seħħ ebda teħid li jitkejjel tas-sustanza tat-test fi tmiem il-perjodu tat-teħid (jew bit-tieni kampjun tat-tisfija). Jekk jista' jintwera li: i) huma ssodisfat l-kriterji ta' validità fil-paragrafu 113; u ii) nuqqas ta' teħid mhuwiex dovut għal xi nuqqas ieħor fit-test (eż. durata tat-teħid mhux twila biżżejjed, nuqqas fit-teknika ta' kif tiżdied is-sustanza mal-ikel li jwassal għal bijodisponibilità batuta, nuqqas ta' sensittività tal-metodu analitiku, ħut li ma jikkonsmax l-ikel, eċċ.); jista' jkun possibbli li jintemm l-istudju mingħajr il-bżonn li jerġa' jsir b'durata tat-teħid itwal. Jekk il-ħidma preliminari indikat li dan jista' jkun il-każ, analiżi tar-rawt, jekk possibbli, għal sustanza tat-test mhux iddiġerita tista' tkun rakkomandata bħala parti minn approċċ ta' "bilanċ tal-massa".

Numri ta' ħut tat-test

B'mod simili għat-test tal-esponiment milwiem, għandu jingħażel ħut b'piż u tul simili, bl-iżgħar ħut li ma jkunx iżgħar minn żewġ terzi tal-piż tal-ikbar (ara l-paragrafi 40-42).

In-numru totali ta' ħut għall-istudju għandu jingħażel fuq il-bażi tal-iskeda ta' kampjunar (tal-inqas kampjun wieħed fi tmiem il-fażi ta' teħid u erba' sa sitt kampjuni matul il-fażi ta' tisfija, iżda skont id-durati tal-fażijiet), filwaqt li jitqiesu s-sensittività tat-teknika analitika, il-konċentrazzjoni li aktarx li sejra tinkiseb fi tmiem il-fażi ta' teħid (fuq il-bażi tal-għarfien preċedenti) u d-durata tat-tisfija (jekk tkun tista' ssir stima bis-saħħa tal-għarfien preċedenti). F'kull okkażjoni għandhom jiġu kampjunati ħames sa għaxar ħutiet, bil-parametri tat-tkabbir (piż u tul totali) li jitkejlu qabel l-analiżi kimika jew lipida.

Minħabba l-varjabbiltà inerenti fid-daqs, ir-rata ta' tkabbir, u l-fiżjoloġija bejn il-ħut u l-varjazzjoni probabbli fil-kwantità ta' dieta mogħtija li kull ħuta tikkonsma, għandu jittieħed kampjun ta' tal-inqas ħames ħutiet f'kull intervall mill-grupp tat-test u ħames ħutiet mill-grupp tal-kontroll sabiex tiġi stabbilita b'mod adegwat il-konċentrazzjoni medja u l-varjabbiltà tagħha. Il-varjabbiltà bejn il-ħut użat aktarx li tikkontribwixxi iktar għall-varjabbiltà mhux ikkontrollata ġenerali fit-test mill-varjabbiltà inerenti fil-metodoloġiji analitiċi użati, u b'ħekk tiġustifika l-użu ta' massimu ta' għaxar ħutiet għal kull punt tal-kampjun f'ċerti każijiet. Madankollu, jekk il-konċentrazzjonijiet ta' sfond tas-sustanza tat-test fil-ħut tal-kontroll ma jistgħux jitkejlu fil-bidu tat-tisfija, l-analiżi kimika ta' żewġ-tliet ħutiet tal-kontroll fl-intervall finali tal-kampjunar biss tista' tkun biżżejjed diment li l-ħut tal-kontroll li jifdal fil-punti tal-kampjunar kollha xorta waħda jiġu kampjunati għall-piż u t-tul totali (sabiex jiġi kampjunat l-istess numru mill-gruppi tat-test u tal-kontroll għat-tkabbir). Il-ħut għandu jinħażen, jintiżen individwalment (anki jekk ikun neċessarju li wara r-riżultati tal-kampjun jiġu kombinati) u għandu jitkejjel it-tul totali.

([1]) Fi studju tal-esponiment milwiem, nofs ħajja ta' 14-il jum tikkorrispondi għal BCF ta' madwar 10 000 L/kg bl-użu ta' ħut ta' 1 g b'rata ta' teħid korrispondenti ta' madwar 500 L/kg/jum (skont l-ekwazzjoni ta' Sijm *et al* (46)).

▼M7

Għal test standard, pereżempju, b'durata ta' tisfija ta' 28 jum inklużi ħames kampjuni ta' tisfija, dan ifisser total ta' 59-120 ħuta mit-test u 50-110 mill-gruppi tal-kontroll, jekk jiġi supponut li t-teknika analitika tas-sustanza tippermetti li l-analiżi tal-kontenut lipidu ssir fuq l-istess ħuta. Jekk l-analiżi lipida ma tistax issir fuq l-istess ħuta bħall-analiżi kimika, u l-użu ta' ħut tal-kontroll għall-analiżi lipida biss ma jkunx fattibbli (ara l-paragrafu 56), ikunu meħtieġa 15-il ħuta oħra (tlieta mill-popolazzjoni tal-istokk fil-bidu tat-test, tlieta mill-grupp tal-kontroll u tlieta mill-grupp tat-test fil-bidu tat-tisfija u tlieta mill-gruppi tal-kontroll u tlieta mill-gruppi tat-test fi tmiem l-esperiment). Eżempju tal-iskeda tal-kampjunar bin-numri tal-ħut jista' jinkiseb mill-Appendiċi 4.

Tagħbija

B'mod simili, għandhom jintużaw proporzjonijiet għoljin ta' ilma għall-ħut bħal fil-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafi 43 u 44). Għad li r-rati ta' tagħbija tal-ħut għall-ilma ma għandhomx effett fuq il-konċentrazzjonijiet tal-esponiment f'dan it-test, hija rakkomandata rata ta' tagħbija ta' 0.1-1.0 g ħut (piż niedi) għal kull litru fil-ġurnata sabiex jinżammu konċentrazzjonijiet adegwati tal-ossiġenu dissolt u jiġi minimizzat l-istress tal-organiżmi tat-test.

Dieta tat-test u Għalf

Matul il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, il-ħut għandu jingħata dieta xierqa kif spjegat iktar 'il fuq (il-paragrafu 117). Jekk it-test isir f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu, il-fluss għandu jkun sospiż filwaqt li jingħata l-ikel lill-ħut.

Matul it-test, id-dieta għall-grupp tat-test għandha taderixxi għal dik deskritta iktar 'il fuq (paragrafi 116-121). Minbarra li jiġu kkunsidrati fatturi speċifiċi għas-sustanza, is-sensittività analitika, il-konċentrazzjoni mistennija fid-dieta f'kundizzjonijiet ambjentali u l-livelli ta' tossiċità kronika/toqol tal-ġisem, l-għażla tal-konċentrazzjoni mira taż-żieda tas-sustanza għandha tqis il-palatabilità tal-ikel (sabiex il-ħut ma jevitax milli jiekol). Il-konċentrazzjoni taż-żieda nominali tas-sustanza tat-test għandha tiġi dokumentata fir-rapport. Fuq il-bażi tal-esperjenza, il-konċentrazzjonijiet taż-żidiet fil-medda ta' 1-1 000 µg/g jipprovdu medda operazzjonali prattika għas-sustanzi tat-test li ma jesibixxux mekkaniżmu tossiku speċifiku. Għal sustanzi li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmu mhux speċifiku, il-livelli tar-residwu tat-tessut ma għandhomx jaqbżu l-5 µmol/g lipidu peress li residwi f'livelli ogħla minn hekk aktarx li jġibu magħhom effetti kroniċi (19) (48) (50) ([1]). Għal sustanzi oħrajn għandha tingħata attenzjoni sabiex ma jseħħ ebda effett avvers mill-esponiment akkumulat (ara l-paragrafu 127). Dan huwa partikolarment minnu jekk ikunu qegħdin jiġu ttestjati iktar minn sustanza waħda fl-istess ħin (ara l-paragrafu 112).

L-ammont xieraq tas-sustanza tat-test jista' jiżdied mal-ikel tal-ħut f'wieħed minn tliet modi, kif spjegat fil-paragrafu 119 u l-Appendiċi 7. Il-metodi u l-proċeduri għaż-żieda tas-sustanza mal-għalf għandhom jiġu dokumentati fir-rapport. Ikel mhux ittrattat jingħata lill-ħut tal-kontroll, u dan ikun fih kwantità ekwivalenti ta' veikolu taż-żejt mhux miżjud jekk dan ikun intuża fl-għalf miżjud għall-faži ta' teħid, jew li jkun ġie ttrattat b'solvent "pur" jekk intuża veikolu tas-solvent għall-preparazzjoni tad-dieta tal-grupp tat-test. Id-dieti ttrattati u mhux ittrattati għandhom jitkejlu b'mod analitiku tal-inqas fi triplikat għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test qabel ma tibda u fi tmiem il-faži ta' teħid. Wara l-esponiment għall-għalf ittrattat (faži ta' teħid), il-ħut (żewġ gruppi) jingħataw ikel mhux ittrattat (faži ta' tisfija).

Il-ħut jingħata porzjon fiss (skont l-ispeċi; eż. madwar 1-2 % tal-piż niedi tal-ġisem kuljum fil-każ ta' trota qawsalla). Ir-rata tal-għalf għandha tingħażel b'tali mod li jiġu evitati tkabbir veloċi u żieda kbira fil-kontenut lipidu. Għandha tiġi rreġistrata r-rata tal-għalf eżatta stabbilita matul l-esperiment. It-tagħlif inizjali għandu jkun ibbażat fuq il-kejliet tal-piż skedati tal-popolazzjoni tal-istokk eżatt qabel ma jibda t-test. L-ammont tal-għalf għandu jiġi aġġustat fuq il-bażi

([1]) Peress li l-konċentrazzjonijiet interni attwali jistgħu jiġu stabbiliti biss wara li jkun sar it-test, hemm bżonn ta' stima tal-konċentrazzjoni interna mistennija (eż. fuq il-bażi tal-BMF mistenni u l-konċentrazzjoni fl-ikel; ara l-Ekwazzjoni A5.8 fl-Appendiċi 5).

▼M7

tal-piżijiet niedja tal-ħut kampjunat f'kull okkażjoni tal-kampjunar sabiex jingħata kunsiderazzjoni lit-tkabbir matul l-esperiment. Il-piżijiet u t-tul tal-ħut fit-tankijiet tat-test u tal-kontroll jistgħu jiġu stmati mill-piżijiet u t-tul totali tal-ħut użat f'kull okkażjoni tal-kampjunar; tiżinx u tkejjilx il-ħut li jifdal fit-tankijiet tat-test u tal-kontroll. Importanti li tinżamm l-istess rata tal-għalf stabbilita matul l-esperiment.

L-għalf għandu jkun osservat sabiex jiġi żgurat li l-ħut ikun qiegħed jikkonsma l-ikel kollu ppreżentat sabiex jiġi garantit li fil-kalkoli jintużaw ir-rati ta' inġestjoni xierqa. L-esperimenti preliminari tal-għalf jew l-esperjenza preċedenti għandhom jingħataw kunsiderazzjoni meta tingħażel ir-rata ta' tagħlif sabiex jiġi żgurat li jiġi kkonsmat l-ikel kollu mit-tagħlif ta' darba kuljum. F'każ li ta' spiss ikun hemm ikel li ma jintmissx, jista' jkun rakkomandat li d-doża tinfirex tul perjodu ta' tagħlif ieħor f'kull jum tal-esperiment (eż. jinbidel it-tagħlif ta' dabra kuljum ma' tagħlif ta' nofs l-ammont darbtejn kuljum). Jekk ikun hemm bżonn, it-tieni tagħlif għandu jseħħ f'ħin stabbilit u jinżamm il-ħin sabiex jgħaddi l-perjodu massimu tal-ħin possibbli qabel ma jiġi kampjunat il-ħut (eż. il-ħin għat-tieni tagħlif jiġi stabbilit fi ħdan l-ewwel nofs ta' jum tal-esperiment).

Għad li ġeneralment il-ħut malajr jikkonsma l-ikel, importanti li jiġi żgurat li s-sustanza tibqa' adsorbita fl-ikel. Għandhom isiru sforzi sabiex jiġi evitat milli s-sustanza tat-test tiġi dispersa fl-ilma mill-ikel, u b'hekk tesponi l-ħut għal konċentrazzjonijiet milwiema tas-sustanza tat-test minbarra r-rotta djetetika. Dan jista' jinkiseb billi jitneħħa kwalunkwe ikel li ma jittikilx (u rawt) mit-tankijiet tat-test u tal-kontroll fi żmien siegħa mit-tagħlif, iżda idealment fi żmien 30 minuta. Barra minn hekk, tista' tintuża sistema li fiha l-ilma jitnaddaf kontinwament b'filtru tal-karbonju attiv sabiex jiġi assorbit kwalunkwe kontaminant “dissolt”. Sistemi bi fluss kontinwu jistgħu jgħinu sabiex jitneħħew malajr partiċelli tal-ikel u sustanzi dissolti ([1]). F'ċerti każijiet, teknika ta' preparazzjoni tal-ikel miżjud modifikata ftit tista' tgħin sabiex tittaffa din il-problema (ara l-paragrafu 119).

Dawl u temperatura

Rigward il-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafu 48), huwa rakkomandat fotoperjodu ta' 12 sa 16-il siegħa u temperatura (± 2 °C) xierqa għall-ispeċi tat-test użata (ara l-Appendiċi 3). It-tip u l-karatteristiċi tad-dawl għandhom ikunu magħrufin u ddokumentati.

Kontrolli

Għandu jintuża grupp tal-kontroll wieħed, bil-ħut li jingħata l-istess porzjon ta' ikel bħall-grupp tat-test iżda mingħajr is-sustanza tat-test fl-għalf. Jekk intuża żejt jew veikolu tas-solvent sabiex tiġi miżjuda s-sustanza fl-għalf fil-grupp tat-test, l-ikel tal-grupp tal-kontroll għandu jiġi ttrattat bl-istess mod iżda mingħajr is-sustanza tat-test sabiex id-dieti tal-grupp tat-test u l-grupp tal-kontroll ikunu ekwivalenti (ara l-paragrafi 121 u 139).

([1]) Il-preżenza tas-sustanza tat-test fil-medium tat-test bħala riżultat tal-eskrezzjoni mill-ħut jew lixxivjazzjoni mill-ikel jaf ma tkunx tista' tiġi evitat għalkollox. Għalhekk, għażla minnhom hija li titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza fl-ilma u fi tmiem il-perjodu ta' teħid, speċjalment jekk jintuża ssettjar semistatiku, bħala għajnuna sabiex jiġi stabbilit jekk seħħx xi esponiment milwiem.

▼M7

Il-Frekwenza tal-Kejliet tal-Kwalità tal-Ilma

Il-kundizzjonijiet deskritti fil-metodu tal-esponiment milwiem japplikaw hawn ukoll, ħlief li t-TOC trid titkejjel biss qabel it-test bħala parti mill-karatterizzazzjoni tal-ilma tat-test (ara l-paragrafu 53).

Kampjunar u Analiżi tal-Ħut u d-Dieta

Analiżi tal-Kampjuni tad-Dieta

Il-kampjuni tad-dieti tat-test u tal-kontroll għandhom jiġu analizzati tal-inqas fi triplikat għas-sustanza tat-test u għall-kontenut lipidu qabel ma tibda u fi tmiem il-fażi ta' teħid. Il-metodi ta' analiżi u l-proċeduri għall-iżgurar u l-omoġenità tad-dieta għandhom ikunu inklużi fir-rapport.

Il-kampjuni għandhom ikunu analizzati għas-sustanza tat-test bil-metodu stabbilit u vvalidat. Għandha ssir ħidma ta' qabel l-istudju sabiex jiġu stabbiliti l-limitu tal-kwantifikazzjoni, l-irkupru perċentwali, l-interferenzi u l-varjabbiltà analitika fil-matriċi tal-kampjun fil-mira. Jekk jiġi ttestjat matejal radjotikkettat, għandhom jitqiesu l-istess kunsiderazzjonijiet bħal dawk għall-metodu tal-esponiment milwiem bl-analiżi tal-għalf li tieħu post l-analiżi tal-ilma (ara l-paragrafu 65).

Analizi tal-Ħut

F'kull okkażjoni tal-kampjunar tal-ħut, sejjer jittieħed kampjun ta' 5-10 individwi mit-trattamenti tal-esponiment u tal-kontroll (f'ċerti każijiet, in-numri ta' ħut tal-kontroll jistgħu jitnaqqsu; ara l-paragrafu 134).

L-okkażjonijiet tal-kampjunar għandhom iseħħu fl-istess ħin f'kull jum tal-esperiment (b'rabta mal-ħin tal-għalf), u għandhom isiru f'ħin li fih ma jkunx probabbli li l-ikel ikun għadu fl-imsaren matul il-fażi ta' teħid u l-parti bikrija tal-fażi ta' tisfija sabiex jiġu evitati kontribuzzjonijiet spurji għall-konċentrazzjonijiet totali tas-sustanza tat-test (jiġifieri l-ħut fil-kampjun għandu jitneħħa fi tmiem jum tal-esperiment, filwaqt li wieħed jiftakar li jum tal-esperiment jibda minn ħin it-tagħlif u jintemm fil-ħin tat-tagħlif li jmiss, madwar 24 siegħa wara. It-tisfija tibda bl-ewwel tagħlif ta' ikel mhux miżjud; ara l-paragrafu 128). L-ewwel kampjun tal-fażi ta' tisfija (meħud ftit wara t-tieni tagħlif b'ikel mhux miżjud) hija importanti peress li tintuża estrapolazzjoni ta' ġurnata qabel minn dan il-kejl sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni fiż-żmien żero ($C_{0,d}$, il-konċentrazzjoni fil-ħut fi tmiem it-teħid/il-bidu tat-tisfija). Inkella, l-apparat gastrointestinali tal-ħut jista' jitneħħa u jiġi analizzat għalih fi tmiem it-teħid u fil-jiem 1 u 3 tat-tisfija.

F'kull okkażjoni tal-kampjunar, il-ħut għandu jitneħħa miż-żewġ reċipjenti tat-test u jiġi ttrattat bl-istess mod kif deskritt fil-metodu milwiem (ara l-paragrafi 61-63).

Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fil-ħut sħiħ (piż niedi) jitkejlu tal-inqas fi tmiem il-fażi ta' teħid u matul il-fażi ta' tisfija kemm fil-gruppi tal-kontroll kif ukoll tat-test. Matul il-fażi ta' tisfija, huma rakkomandati erba' sa sitt punti tal-kampjunar (eż. 1, 3, 7, 14 u 28 jum). Inkella, jista' jiġi inkluż punt tal-kampjunar ieħor wara t-teħid għal 1-3 ijiem sabiex tiġi stmata l-effiċjenza tal-assimilazzjoni mill-fażi lineari ta' teħid għall-ħut filwaqt li ż-żmien ikun għadu qrib il-perjodu tal-esponiment. Jeżistu żewġ devjazzjonijiet ewlenin mill-iskeda: i) jekk tintuża fażi ta' teħid estiża għall-finijiet ta' investigazzjoni tal-kinetika tat-teħid, sejjer ikun hemm punti tal-kampjunar addizzjonali matul il-fażi ta' teħid u, b'hekk, sejjer ikollu jintuża iktar ħut (ara l-paragrafu 126); ii) jekk l-istudju ġie terminat

▼M7

fi tmiem il-fażi ta' teħid minħabba ebda teħid li jista' jitkejjel (ara l-paragrafu 131). Il-ħut individwali li jittieħed fil-kampjun għandu jintiżen (u jitkejjel it-tul totali tiegħu) sabiex ikunu jistgħu jiġu stabbiliti l-kostanti tar-rata ta' tkabbir. Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza f'tessut speċifiku tal-ħut (porzjonijiet li jittieklu u li ma jittiklux) jistgħu jitkejlu wkoll fi tmiem il-ħinijiet ta' teħid u l-ħinijiet ta' tisfija magħżulin. Jekk jiġi ttestjat matejal radjotikkettat, għandhom jitqiesu l-istess kunsiderazzjonijiet bħal dawk għall-metodu tal-esponiment milwiem bl-analiżi tal-għalf li tieħu post l-analiżi tal-ilma (ara l-paragrafu 65).

Għall-użu perjodiku ta' sustanza ta' referenza (ara l-paragrafu 25), idealment il-konċentrazzjonijiet jitkejlu fil-grupp tat-test fi tmiem it-teħid u fil-ħinijiet ta' tisfija kollha speċifikati għas-sustanza tat-test (ħut sħiħ); il-konċentrazzjonijiet iridu jiġu analizzati biss fil-grupp tal-kontroll fi tmiem it-teħid (ħut sħiħ). F'ċerti ċirkustanzi (pereżempju jekk it-tekniki tal-analiżi għas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza jkunu inkompatibbli, b'tali mod li jkun hemm bżonn ta' iktar ħut sabiex tiġi segwita l-iskeda tal-kampjunar), jista' jintuża approċċ ieħor kif ġej sabiex jitnaqqas in-numru ta' ħut addizzjonali meħtieġ. Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ta' referenza jitkejlu matul it-tisfija biss fil-jiem 1, 3 u żewġ punti ta' kampjunar oħrajn, magħżulin b'tali mod li l-istimi affidabbli tal-konċentrazzjoni fiż-żmien żero ($C_{0,d}$) u k_2 ikunu jistgħu jsiru għas-sustanza ta' referenza.

Jekk possibbli, il-kontenut lipidu tal-ħut individwali għandu jiġi stabbilit f'kull okkażjoni tal-kampjunar, jew tal-inqas fil-bidu u fi tmiem il-fażi ta' teħid u fi tmiem il-fażi ta' tisfija. (ara l-paragrafi 56 u 67). Skont il-metodu analitiku (irreferi għall-paragrafu 67 u għall-Appendiċi 4), jista' jkun possibbli li jintuża l-istess ħut għad-determinazzjoni tal-kontenut lipidu kif ukoll tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test. Dan huwa ppreferut għaliex inaqqas in-numri ta' ħut. Madankollu, jekk dan ma jkunx possibbli, jista' jintuża l-istess approċċ kif deskritt fil-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafu 56 għal dawn l-għażliet alternattivi ta' kejl tal-lipidu). Il-metodu użat sabiex jiġi kkwantifikat il-kontenut lipidu għandu jiġi ddokumentat fir-rapport.

Kwalità tal-metodu analitiku

Għandhom isiru verifiki sperimentali sabiex jiġu żgurati l-ispeċifiċità, ir-reqqa, il-preċiżjoni u r-riproduċibbilità tat-teknika analitika speċifika għas-sustanza, kif ukoll l-irkupri tas-sustanza tat-test kemm mill-ikel kif ukoll mill-ħut.

Kejl tat-tkabbir tal-ħut

Fil-bidu tat-test, irid jintiżen kampjun ta' ħut mill-popolazzjoni tal-istokk (u jitkejjel it-tul totali ta' dawn). Dan il-ħut għandu jiġi kampjunat ftit qabel l-ewwel tagħlif miżjud (eż. siegħa), u jiġi assenjat għall-jum 0 tal-esperiment. In-numru ta' ħut għal dan il-kampjun għandu jkun tal-inqas l-istess bħal dak għall-kampjuni matul it-test. Uħud minn dawn jistgħu jkunu l-istess ħutiet użati għall-analiżi lipida qabel ma tibda l-fażi ta' teħid (ara l-paragrafu 153). F'kull intervall tal-kampjunar, il-ħut l-ewwel jintiżen u jitkejjel it-tul tiegħu. F'kull ħuta individwali, il-piż imkejjel (u t-tul) għandu jkun marbut mal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika analizzata (u l-kontenut lipidu, jekk applikabbli), pereżempju bl-użu ta' kodiċi identifikatur uniku għal kull ħuta fil-kampjun. Il-kejliet tal-ħut kampjunat jistgħu jintużaw sabiex jiġu stmati l-piż (u t-tul) tal-ħut li jifdal fit-tankijiet tat-test u tal-kontroll.

Evalwazzjoni tal-Esperiment

Kuljum għandhom isiru u jiġu rreġistrati osservazzjonijiet tal-mortalità. Għandhom isiru osservazzjonijiet oħrajn għal effetti avversi, pereżempju għal imġiba jew pigmentazzjoni anormali, u dawn għandhom jiġu rreġistrati. Il-ħut jitqies mejjet jekk ma jkun hemm ebda ċaqliq respiratorju u ma tiġi individwata ebda reazzjoni għal stimolu mekkaniku ħafif. Kwalunkwe ħut mejjet jew fi stat moribond ċar għandu jitneħħa.

▼M7

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

Ir-riżultati tat-test jintużaw sabiex jinkiseb il-kostant tar-rata ta' tisfija (k_2) bħala funzjoni tal-piż niedi totali tal-ħut. Jiġi kkalkolat il-kostant tar-rata ta' tkabbir, k_g, ibbażat fuq iż-żieda medja fil-piż tal-ħut, u dan jintuża sabiex jiġi prodott il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir, k_{2g}, jekk xieraq. Barra minn hekk, għandhom ikunu rrapportati l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (a; assorbiment mill-imsaren), il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kinetika (BMF_K) (jekk ikun hemm bżonn ikkoreġut għat-tkabbir, BMF_{Kg}), il-valur ikkoreġut għal-lipidu tiegħu (BMF_{KL} jew BMF_{KgL}, jekk ikkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir) u r-rata tat-tagħlif. Barra minn hekk, jekk tista' ssir stima tal-ħin għall-istat stazzjonarju fil-fażi ta' teħid (eż. 95 % tal-istat stazzjonarju jew $t_{95} = 3.0/k_2$), stima tal-BMF fi stat stazzjonarju (BMF_{SS}) tista' tkun inkluża (ara l-paragrafi 105 u 106, u l-Appendiċi 5) jekk il-valur t_{95} jindika li jista' jkun li ntlaħqu l-kundizzjonijiet tal-istat stazzjonarju. Għandha tiġi applikata l-istess korrezzjoni tal-lipidu għal dan il-BMF_{SS} bħalma tiġi applikata għall-BMF derivat kinetikament (BMF_K) sabiex jinħareġ valur ikkoreġut għal-lipidu, BMF_{SSL} (kun af li ma hemm ebda proċedura miftiehma disponibbli sabiex jiġi kkoreġut BMF fi stat stazzjonarju għad-dilwizzjoni tat-tkabbir). Il-formuli u l-kalkoli eżempji huma ppreżentati fl-Appendiċi 7. Hemm approċċi disponibbli li jagħmluha possibbli li jiġi stmat fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) minn dejta ġġenerata fl-istudju djetetiku. Dan huwa diskuss fl-Appendiċi 8.

Dejta dwar il-piż/it-tul tal-ħut

Il-pożijiet niedja u t-tul tal-ħut individawli għall-perjodi ta' żmien kollha jitqiegħdu f'tabella b'mod separat għall-gruppi tat-test u tal-kontroll għall-jiem tal-kampjunar kollha matul il-fażi ta' teħid (il-popolazzjoni tal-istokk għall-bidu tat-teħid; il-grupp tal-kontroll u l-grupp tat-test għal tmiem it-teħid u, jekk issir, il-fażi bikrija (eż. jum 1-3 tat-teħid) u l-fażi ta' tisfija (eż. il-jiem 1, 2, 4, 7, 14, 28, għall-grupp tal-kontroll u l-grupp tat-test). Il-piż huwa l-kejl ippreferut tat-tkabbir għall-finijiet ta' korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir. Ara hawn taħt (paragrafi 162 u 163) u l-Appendiċi 5 għall-metodu/i użat sabiex id-dejta tiġi kkoreġuta għad-dilwizzjoni tat-tkabbir.

Dejta dwar il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut

Il-kejliet tar-residwu fit-test tal-ħut individwali (jew kampjuni tal-ħut raggruppati jekk ma jkunux possibbli kejliet tal-ħut individwali), mogħtijin f'termini tal-konċentrazzjoni tal-piż niedi (w/w), jitqiegħdu f'tabella għall-ħut tal-kontroll u tat-test għal ħinijiet tal-kampjunar individwali. Jekk saret analiżi tal-lipidu fuq kull ħuta fil-kampjun, jistgħu jinkisbu u jiddaħħlu f'tabella l-konċentrazzjonijiet individwali kkoreġuti għal-lipidu, f'termini tal-konċentrazzjoni tal-lipidu (lipidu w/w).

— Il-kejliet tar-residwu tas-sustanza tat-test f'ħut individwali (jew kampjuni tal-ħut raggruppati jekk ma jkunx possibbli li jsiru kejliet tal-ħut individwali, ara l-paragrafu 66) għall-perjodu ta' tisfija jiġu kkonvertiti fil-logaritmi naturali tagħhom u jiġu plottjati kontra ż-żmien (jum). Jekk spezzjoni viżiva tal-plott turi eċċezzjonijiet ovvji, jista' jiġi applikat test tal-eċċezzjonijiet statistikament validu sabiex jitneħħew punti ta' dejta spurji kif ukoll tingħata ġustifikazzjoni dokumentata għaliex tneħħew.

— Korrelazzjoni tal-inqas kaxex lineari tiġi kkalkolata għad-dejta dwar ln(konċentrazzjoni) vs. tisfija (jum). Il-pendil u l-interċetta tal-linja jiġu rrapportati bħala l-kostant totali tar-rata ta' tisfija (k_2) u l-logaritma naturali tal-konċentrazzjoni derivata fiż-żmien żero ($C_{0,d}$) (ara l-Appendiċi 5 u l-Appendiċi 7 għal iktar dettalji). Jekk dan ma jkunx possibbli għaliex il-konċentrazzjonijiet jaqgħu taħt il-limitu tal-kwantifikazzjoni għat-tieni kampjun ta' tisfija, tista' ssir stima konservattiva tal-k_2 (ara l-Appendiċi 7).

— Il-varjanzi fil-pendil u l-interċetta tal-linja huma kkalkolati bl-użu tal-proċeduri statistiċi standard u l-intervalli ta' kunfidenza ta' 90 % (jew 95 %) madwar dawn ir-riżultati jiġu evalwati u ppreżentati.

▼M7

— Il-konċentrazzjoni medja mkejla fil-ħut għall-jum finali tat-teħid (il-konċentrazzjoni fiż-żmien żero mkejla, $C_{0,m}$) tiġi kkalkolata wkoll u titqabbel mal-valur derivat $C_{0,d}$. F'każ li l-valur derivat ikun inqas mill-valur imkejjel, id-differenza tista' tissuġġerixxi l-preżenza ta' ikel miżjud mhux iddiġerit fl-imsaren. Jekk il-valur derivat ikun ferm ogħla mill-valur imkejjel, dan jista' jkun indikazzjoni li l-valur derivat mir-rigressjoni lineari tad-dejta dwar it-tisfija huwa żbaljat u għandu jerġa' jiġi evalwat (ara l-Appendiċi 7).

Rata ta' tisfija u fattur ta' bijomanjifikazzjoni

Sabiex jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni mid-dejta, l-ewwel għandha tinkiseb l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (adsorbiment tas-sustanza tat-test fl-imsaren, α). Sabiex isir hekk, għandha tintuża l-ekwazzjoni A7.1 fl-Appendiċi 7, li teħtieġ li jkunu magħrufin il-konċentrazzjoni derivata fil-ħut fiż-żmien żero tal-fażi ta' tisfija ($C_{0,d}$), il-kostant (totali) tar-rata ta' tisfija (k_2), il-konċentrazzjoni fl-ikel (C_{food}), il-kostant tar-rata ta' inġestjoni tal-ikel (I) u d-durata tal-perjodu ta' teħid (t). Il-pendil u l-interċetta tar-relazzjoni lineari bejn ln(konċentrazzjoni) u l-ħin ta' tisfija jiġu rrapportati bħala l-kostant totali tar-rata ta' tisfija (k_2 = pendil) u l-konċentrazzjoni fiż-żmien żero ($C_{0,d} = e_{interċetta}$), kif spjegat hawn fuq. Il-valuri derivati għandhom jiġu vverifikati għall-plawżibbiltà bijoloġika (eż. l-effiċjenza tal-assimilazzjoni bħala frazzjoni mhijiex ikbar minn 1). *(I)* hija kkalkolata bid-diviżjoni tal-massa tal-ikel bil-massa tal-ħut magħlef kuljum (jekk jingħata ikel li jiżen 2 % tal-piż tal-ġisem, *(I)* sejjer ikun 0.02). Madankollu, ir-rata ta' tagħlif użata fil-kalkolu jaf ikollha bżonn tiġi aġġustata għat-tkabbir tal-ħut (dan jista' jsir bl-użu tal-kostant magħruf tar-rata ta' tkabbir sabiex jiġi stmat il-piż tal-ħut f'kull punt ta' żmien matul il-fażi ta' teħid; ara l-Appendiċi 7). F'każijiet li fihom ma jistgħux jinkisbu k_2 and $C_{0,d}$ għaliex, pereżempju, il-konċentrazzjonijiet waqgħu taħt il-limitu ta' detezzjoni għat-tieni kampjun ta' tisfija, jistgħu jsiru stima konservattiva ta' k_2 u BMF_k "ta' livell superjuri" (ara l-Appendiċi 7).

Ladarba tinkiseb l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (α), il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni jista' jiġi kkalkolat billi α tiġi moltiplikata bil-kostant tar-rata ta' inġestjoni (I) u bid-diviżjoni bil-kostant (totali) tar-rata ta' tisfija (k_2). Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għat-tkabbir huwa kkalkolat bl-istess mod iżda bl-użu tal-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2g}; ara l-paragrafi 162 u 163. Stima alternattiva tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni tista' tinkiseb jekk l-analiżi tat-tessut saret fuq ħut kampjunat fil-fażi lineari bikrija tal-fażi ta' teħid; ara l-paragrafu 151 u l-Appendiċi 7. Dan il-valur jirrappreżenta stima indipendenti tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni għal organiżmu essenzjalment mhux espost (jiġifieri l-ħut huwa qrib il-bidu tal-fażi ta' teħid). L-effiċjenza tal-assimilazzjoni stmata mid-dejta ta' tisfija normalment tintuża sabiex jinkiseb il-BMF.

Korrezzjoni għal-Lipidu u Korrezzjoni tad-Dilwizzjoni tat-Tkabbir

It-tkabbir tal-ħut matul il-fażi ta' tisfija jista' jbaxxi l-konċentrazzjonijiet kimiċi mkejlin fil-ħut bl-effett li l-kostant totali tar-rata ta' tisfija, k_2, ikun ikbar minn dak li jirriżulta minn proċessi ta' tneħħija (eż. metaboliżmu, eġestjoni) waħedhom (ara l-paragrafu 72). Il-kontenuti lipidi tal-ħut tat-test (li huma ferm assoċjati mal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi idrofobiċi) u kontenuti lipidi tal-ikel jistgħu jvarjaw biżżejjed fil-prattika tant li jkun hemm bżonn li jiġu kkoreġuti sabiex il-fatturi ta' bijomanjifikazzjoni jkunu ppreżentati b'mod sinifikanti. Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni għandu jiġi kkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir (bħall-BCF kinetiku fil-metodu tal-esponiment milwiem) u jiġi kkoreġut għall-kontenut lipidu tal-ikel marbut ma' dak tal-ħut (il-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu). L-ekwazzjonijiet u l-eżempji għal dawn il-kalkoli jistgħu jinkisbu fl-Appendiċi 5 u l-Appendiċi 7, rispettivament.

Sabiex issir korrezzjoni għad-dilwizzjoni tat-tkabbir, għandu jiġi kkalkolat il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2g}) (ara l-Appendiċi 5 għall-ekwazzjonijiet). Imbagħad, dan il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2g}) jintuża sabiex jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għat-tkabbir, bħal fil-paragrafu 73. F'ċerti każijiet dan l-approċċ ma jkunx possibbli. Approċċ alternattiv li jevita l-ħtieġa ta' korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir jinvolvi l-użu ta' dejta dwar it-tisfija tal-massa tas-sustanza tat-test għal kull

▼M7

ħuta (fuq il-bażi tal-ħuta sħiħa) minflok id-dejta tas-soltu dwar il-massa tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-massa tal-ħut (konċentrazzjoni). Dan jista' jinkiseb faċilment peress li t-testijiet skont dan il-metodu għandhom jorbtu l-konċentrazzjonijiet tat-tessut irreġistrati mal-piżijiet tal-ħut individwali. Il-proċedura sempliċi għal dan hija spjegata fl-Appendiċi 5. Kun af li l-k_2 xorta waħda għandu jiġi stmat u rrapportat, anki jekk jintuża dan l-approċċ.

Sabiex issir korrezzjoni għall-kontenut lipidu tal-ikel u l-ħut meta l-analiżi tal-lipidu ma tkunx saret fuq il-ħut kollu fil-kampjun, jinkisbu l-frazzjonijiet lipidi medji (w/w) fil-ħut u fl-ikel ([1]). Imbagħad jiġi kkalkolat il-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu (L_c) bid-diviżjoni tal-frazzjoni tal-lipidu medju fil-ħut bil-frazzjoni tal-lipidu medju fl-ikel. Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni, ikkoreġut għat-tkabbir jew le skont kif ikun applikabbli, jiġi diviż bil-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu sabiex jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għal-lipidu.

Jekk l-analiżijiet kimiċi u lipidi saru fuq l-istess ħut fl-istess punt tal-kampjunar, tista' tintuża d-dejta dwar it-tessut ikkoreġuta għal-lipidu għal ħut individwali sabiex jiġi kkalkolat BMF ikkoreġut għal-lipidu direttament (ara (37)). Il-plott tad-dejta dwar il-konċentrazzjoni kkoreġuta għal-lipidu jagħti $C_{0,d}$ fuq bażi lipida u k_2. Imbagħad, l-analiżi matematika tista' tkompli bl-użu tal-istess ekwazzjonijiet fl-Appendiċi 7, iżda l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (*a*) tiġi kkalkolata bl-użu tal-kostant tar-rata ta' inġestjoni tal-ikel normalizzata għal-lipidu (I_{lipidu}) u l-konċentrazzjoni djetetika fuq bażi lipida ($C_{ikel\text{-}lipidu}$). Imbagħad, il-parametri kkoreġuti għal-lipidu jintużaw b'mod simili sabiex jiġi kkalkolat il-BMF (kun af li l-korrezzjoni tal-kostant tar-rata ta' tkabbir għandha tiġi applikata wkoll għall-frazzjoni tal-lipidu minflok il-piż niedi tal-ħut sabiex jiġi kkalkolat il-BMF_{KgL} ikkoreġut għat-tkabbir u kkoreġut għal-lipidu).

Interpretazzjoni tar-riżultati

Fil-prinċipju, it-tkabbir medju fil-grupp tat-test kif ukoll f'tal-kontroll ma għandux ikun wisq differenti sabiex jiġu eskluži l-effetti tossiċi. Il-kostanti tar-rata ta' tkabbir jew il-kurvi tat-tkabbir taż-żewġ gruppi għandhom jitqabblu permezz ta' proċedura xierqa ([2])).

Rapport tat-test

Wara li jintemm l-istudju, jitħejja rapport finali li jkun fih l-informazzjoni dwar *is-Sustanza tat-Test, l-Ispeċi tat-Test* u *l-Kundizzjonijiet tat-Test* kif elenkata fil-paragrafu 81 (bħal fil-każ tal-metodu tal-esponiment milwiem). Barra minn hekk, hija meħtieġa l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

— Kwalunkwe informazzjoni dwar l-istabilità tas-sustanza fl-ikel imħejji;

([1]) Dan l-approċċ huwa speċifiku għall-istudju djetetiku, differenti mill-proċedura segwita fl-esponiment milwiem, u b'hekk intużat il-kelma "korrezzjoni" minflok "normalizzazzjoni" sabiex tiġi evitata konfużjoni — ara wkoll in-nota f'qiegħ il-paġna (106).

([2]) Jista' jsir test-*t* fuq il-kostanti tar-rata ta' tkabbir, sabiex jiġi ttestjat dwar jekk it-tkabbir ivarjax bejn il-grupp tal-kontroll u dak tat-test, jew test-*F* fil-każ ta' analiżi tal-varjanza. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jintuża test tal-proporzjon ta' probabilità jew test-*F* sabiex jgħin fl-għażla tal-mudell tat-tkabbir xieraq (monografff 54 tal-OECD, (32).

▼M7

Kundizzjonijiet tat-test:

— Il-konċentrazzjoni nominali tas-sustanza fl-ikel, it-teknika ta' kif tiżdied is-sustanza, l-ammont ta' veikolu (lipidu) użat fil-proċess ta' żieda tas-sustanza fl-ikel (jekk jintuża), il-kejliet tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dieta miżjuda bis-sustanza għal kull analiżi (tal-inqas fi triplikat qabel il-bidu tal-istudju u tmiem it-teħid) u l-valuri medji;

— Jekk jintuża, it-tip u l-kwalità taż-żejt trasportatur jew is-solvent (grad, fornitur, eċċ.) użat għaż-żieda tas-sustanza mal-ikel;

— It-tip ta' ikel użat (analiżi prossima ([1]), grad jew kwalità, fornitur, eċċ.), ir-rata tat-tagħlif matul il-fażi ta' teħid, l-ammont ta' ikel mogħti u l-frekwenza (inkluż kwalunkwe aġġustament fuq il-bażi tal-piż tal-ħut fil-kampjun);

— Il-ħin li fih inġabar u li fih ġie ewtanizzat il-ħut għall-analiżi kimika għal kull punt tal-kampjunar (eż. siegħa qabel it-tagħlif tal-ġurnata li jmiss);

Ir-riżultati:

— Ir-riżultati minn kwalunkwe ħidma ta' studju preliminari;

— Informazzjoni dwar kwalunkwe effett avvers osservat.

— Deskrizzjoni sħiħa tal-proċeduri ta' analiżi kimika kollha mħaddmin inklużi l-limiti ta' detezzjoni u l-kwantifikazzjoni, il-varjabbiltà u l-irkupru.

— Il-konċentrazzjonijiet ta' lipidu mkejlin fl-ikel (dieta miżjuda u tal-kontroll), il-valuri individwali, medji u d-devjazzjonijiet standard;

— Dejta f'tabella tal-piż (u t-tul) tal-ħut, b'rabta mal-ħut individwali, kemm għall-gruppi tal-kontroll u tal-esponiment (pereżempju bl-użu ta' identifikaturi uniċi għal kull ħuta) u kalkoli, il-kostant(i) tar-rata ta' tkabbir derivat u intervall(i) ta' kunfidenza ta' 95 %;

— Id-dejta f'tabella dwar il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut, il-konċentrazzjoni medja mkejla fi tmiem it-teħid ($C_{0,m}$), u l-kostant (totali) derivat tar-rata ta' tisfija (k_2) u l-konċentrazzjoni fil-ħut fil-bidu tal-fażi ta' tisfija ($C_{0,d}$) flimkien mal-varjanzi f'dawn il-valuri (pendil u interċetta);

— Id-dejta f'tabella dwar il-kontenuti ta' lipidu fil-ħut (elenkata kontra l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza speċifiċi, jekk applikabbli), il-valuri medji għall-grupp tat-test u l-kontroll fil-bidu tat-test, tmiem it-teħid u tmiem it-tisfija;

— Il-kurvi (inkluża d-dejta mkejla kollha), li juru dan li ġej (jekk applikabbli, il-konċentrazzjonijiet jistgħu jiġu espressi b'rabta mal-ġisem sħiħ tal-annimal jew tessuti speċifiċi tiegħu):

  — it-tkabbir (jiġifieri l-piż tal-ħut (u t-tul) vs il-ħin) jew il-piż trasformat tal-logaritma naturali vs il-ħin;

([1]) Teknika ta' analiżi tal-oġġetti tal-ikel għall-kontenut ta' proteina, lipidu, fibra mhux raffinata u rmied; din l-informazzjoni normalment tkun disponibbli mingħand il-fornitur tal-għalf.

▼M7

— it-tisfija tas-sustanza tat-test fil-ħut; u

— il-konċentrazzjoni trasformata tal-logaritma naturali (f'konċentrazzjoni) vs il-ħin tat-tisfija (inkluż il-kostant tar-rata ta' tisfija derivat k_2, u l-konċentrazzjoni derivata tal-logaritma naturali fil-ħut fil-bidu tal-fażi ta' tisfija, $C_{0,d}$).

— Jekk spezzjoni viżiva ta' plott turi eċċezzjonijiet ovvji, jista' jiġi applikat test tal-eċċezzjonijiet statistikament validu sabiex jitneħħew punti ta' dejta spurji kif ukoll tingħata ġustifikazzjoni dokumentata għaliex tneħħew.

— Il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir u n-nofs ħajja kkoreġuta għat-tkabbir ikkalkolati.

— L-effiċjenza tal-assimilazzjoni (α) ikkalkolata.

— BMF djetetiku "mhux raffinat" BMF kinetiku kkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir u l-lipidu ("mhux raffinat" u kkoreġut għal-lipidu fuq il-bażi tal-piż niedi tal-ħut sħiħ), il-BMF speċifiku għat-tessut jekk applikabbli.

— Kwalunkwe informazzjoni li tikkonċerna metaboliti radjotikkettati tas-sustanza tat-test u l-akkumulazzjoni tagħhom.

— Kwalunkwe ħaġa li mhijiex tas-soltu dwar it-test, kwalunkwe devjazzjoni minn dawn il-proċeduri, u kwalunkwe informazzjoni rilevanti oħra.

— Tabella li tiġbor id-dejta mkejla u kkalkolata rilevanti, kif spjegat hawn;

Kostanti tar-Rata ta' Tisfija tas-Sustanza u Fatturi ta' Bijomanjifikazzjoni (BMF_K)	
k_g (kostant tar-rata ta' tkabbir; jum^{-1}):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
k_2 (kostant totali tar-rata tat-tisfija, jum:	Daħħal Valur (95 % CI)
k_{2g} (kostant tar-rata ta' tisfija korrett għat-tkabbir; jum^{-1}):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
$C_{0,m}$ (konċentrazzjoni mkejla fiż-żmien żero, il-konċentrazzjoni fil-ħut fi tmiem it-teħid) (µg/g):	Daħħal Valur ± SD (2)
$C_{0,d}$ (konċentrazzjoni fiż-żmien żero derivata tal-fażi ta' tisfija; µg/g):	Daħħal Valur ± SD (2)
I (rata ta' inġestjoni tal-għalf stabbilita; g ikel/g ħut/jum):	Daħħal Valur
I_g (rata ta' tagħlif effettiva, aġġustata għat-tkabbir; g ikel/g ħut/jum) (2):	Daħħal Valur ± SD (2)
C_{food} (konċentrazzjoni kimika fl-ikel; µg/g):	Daħħal Valur ± SD (2)
α (effiċjenza tal-assimilazzjoni tas-sustanza):	Daħħal Valur ± SD (2)
BMF_K (BMF djetetiku kinetiku):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)
BMF_{Kg} (BMF djetetiku kinetiku kkoreġut għat-tkabbir):	Daħħal Valur (95 % CI) (1)

▼**M7**

Kostanti tar-Rata ta' Tisfija tas-Sustanza u Fatturi ta' Bijomanjifikazzjoni (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (nofs ħajja kkoreġuta għat-tkabbir f'jiem);	Daħħal Valur ± SD ([2])
Lc (fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu):	Daħħal Valur
BMF_{KgL} (BMF kinetiku kkoreġut għat-tkabbir u kkoreġut għal-lipidu):	Daħħal Valur
BMF_{SS-L} (BMF indikattiv fi stat stazzjonarju kkoreġut għal-lipidu) ([2]):	Daħħal Valur ± SD ([2])
([1]) CI: intervall ta' kunfidenza (fejn ikun possibbli li jiġi stmat) ([2]) SD: Devjazzjoni standard (fejn ikun possibbli li tiġi stmata)	

TAGĦRIF

(1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test.*

(2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

(4) Chapter A.8 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.*

(5) Chapter A.24 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method.*

(6) Chapter A.23 of this Annex, *Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method.*

(7) Chapter C.7 of this Annex, *Hydrolysis as a Function of pH.*

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) Chapter A.5 of this Annex, *Surface Tension of Aqueous Solutions.*

(10) Chapter A.4 of this Annex, *Vapour Pressure.*

(11) Chapter C.4 of this Annex, *Ready Biodegradability.*

(12) Chapter C.29 of this Annex, *Ready Biodegradability — CO_2 in sealed vessels*

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) Chapter C.47 of this Annex, *Fish, Early-Life Stage Toxicity Test.*

(23) Chapter C.15 of this Annex, *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*

(24) Chapter C.14 of this Annex, *Fish, Juvenile Growth Test.*

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼**M7**

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

L-effiċjenza tal-assimilazzjoni (α) hija kejl tal-ammont relattiv tas-sustanza assorbita mill-imsaren fl-organiżmu (α hija mingħajr unità, iżda spiss tingħata bħala perċentwal iktar milli frazzjoni).

Ġeneralment il-bijoakkumulazzjoni tissejjaħ proċess li fih il-konċentrazzjoni tas-sustanza f'organiżmu tilħaq livell li jaqbeż dak fil-medium respiratorju (eż. l-ilma għal ħuta jew l-arja għal mammiferu), id-dieta, jew it-tnejn (1).

Il-bijokonċentrazzjoni hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ġo jew fuq organiżmu (jew tessuti speċifiċi tiegħu) relatata mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-medium li jiċċirkundaha.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF jew K_B) fi kwalunkwe ħin matul il-fażi ta' teħid ta' dan it-test tal-akkumulazzjoni hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ġo/fuq il-ħut jew it-tessuti speċifiċi tiegħu (C_f bħala mg/kg) diviża bil-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-mezz li jiċċirkundaha (C_w bħala mg/l). BCF huwa espress f'l·kg^{-1}. Jekk jogħġbok kun af li l-korrezzjonijiet għat-tkabbir u/jew il-kontenut lipidu standard mhumiex meqjusin.

Il-bijomanjifikazzjoni hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ġo jew fuq organiżmu (jew tessuti speċifiċi tiegħu) relatata mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel.

Il-*fattur ta' bijomanjifikazzjoni* (BMF) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza fi predatur b'rabta mal-konċentrazzjoni fil-priża (jew l-ikel) tal-predatur fi stat staz-zjonarju. Fil-metodu deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, l-esponiment permezz tal-fażi milwiema jiġi evitat bir-reqqa u, b'hekk, valur tal-BMF minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jitqabbel direttament ma' valur tal-BMF minn studju prattiku (li fih jistgħu jiġu kombinati l-esponiment mill-ilma kif ukoll l-esponiment djetetiku).

Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika (BMF djetetiku) hwua t-terminu użat f'dan il-metodu ta' ttestjar sabiex jiġi deskritt ir-riżultat tat-test ta' esponiment djetetiku, li fih l-esponiment permezz tal-fażi milwiema jiġi evitat bir-reqqa u, b'hekk, il-BMF djetetiku minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jitqabbel direttament ma' valur tal-BMF minn studju prattiku (li fih jistgħu jiġu kombinati l-esponiment mill-ilma kif ukoll l-esponiment djetetiku).

Il-fażi ta' tisfija jew ta' wara l-esponiment (telf) hija l-ħin, wara t-trasferiment tal-ħut tat-test minn medium li fih is-sustanza tat-test għal medium liberu ta' dik is-sustanza, li matulu tiġi studjata t-tisfija (jew it-telf nett) tas-sustanza mill-ħut tat-test (jew tessut speċifiku tiegħu).

Il-kostant tar-rata ta' tisfija (telf) (k_2) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut tat-test (jew tessuti speċifiċi tiegħu) wara t-trasferiment tal-ħut tat-test minn medium li fih is-sustanza tat-test għal medium liberu ta' dik is-sustanza (k_2 huwa espress f'jum^{-1}).

Il-karbonju organiku dissolt (DOC) huwa kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbonju li joriġina minn sorsi organiċi dissolti fil-media tat-test.

Il-fażi tal-esponiment jew ta' teħid hija ż-żmien li matulu l-ħut jiġu esposti għas-sustanza tat-test.

Ir-rata ta' inġestjoni tal-ikel (I) hija l-ammont medju ta' ikel meħud minn kull ħuta kuljum, b'rabta mal-piż medju stmat tal-ġisem tal-ħut sħiħ (espress f'termini ta' g ikel/g ħut/jum).

▼M7

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) huwa l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' teħid, k_1, għall-kostant tar-rata ta' tisfija, k_2 (jiġifieri k_1/k_2 — ara d-definizzjonijiet korrispondenti f'dan l-Appendiċi). Fil-prinċipju, il-valur għandu jkun komparabbli mal-BCF_{SS} (ara d-definizzjoni iktar 'il fuq), iżda jista' jkun hemm devjazzjonijiet jekk l-istat stazzjonarju kien inċert jew jekk ġew applikati korrezzjonijiet għat-tkabbir għall-BCF kinetiku.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika normalizzat għal-lipidu (BCF_{KL}) huwa normalizzat għal ħuta b'kontenut lipidu ta' 5 %.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika kkoreġut għat-tkabbir normalizzat għal-lipidu (BCF_{KgL}) huwa normalizzat għal ħuta b'kontenut lipidu ta' 5 % u kkoreġut għat-tkabbir matul il-perjodu ta' studju kif spjegat fl-Appendiċi 5.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju normalizzat għal-lipidu (BCF_{SSL}) huwa normalizzat għal ħuta b'kontenut lipidu ta' 5 %.

Sustanza multikostitwenti hija definita għall-fini tar-REACH bħala sustanza li għandha iktar minn kostitwent ewlieni wieħed preżenti f'konċentrazzjoni ta' bejn 10 % u 80 % (w/w).

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (K_{OW}) huwa l-proporzjon tas-solubilità ta' sustanza f'*n*-ottanol u ilma f'ekwilibriju (Metodi A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); espress ukoll bħala P_{OW}. Il-logaritma ta' K_{OW} tintuża bħala indikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza għal bijokonċentrazzjoni minn organiżmi akwatiċi.

Il-karbonju organiku partikulat (POC) huwa kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbonju li joriġina minn sorsi organiċi sospiżi fil-media tat-test.

Il-mikroestrazzjoni tal-faża solida (SPME) hija teknika analitika mingħajr solvent żviluppata għal sistemi dilwiti. F'dan il-metodu, fibra miksija b'polimeru tiġi esposta għall-fażi gassuża jew likwida li fiha l-analit ta' interess. Ġeneralment, jiġi impost żmien miminu tal-analiżi sabiex jiġu stabbiliti kundizzjonijiet ta' ekwlibriju bejn il-fażijiet solidi u fluwidi, fir-rigward tal-ispeċi mkejla. Imbagħad, tkun tista' tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tal-analit ta' interess direttament mill-fibra jew wara li tiġi estratta mill-fibra f'solvent, skont it-teknika ta' determinazzjoni.

Stat stazzjonarju jintlaħaq fil-plott tas-sustanza tat-test fil-ħut (C_f) kontra l-ħin meta l-kurva ssir parallela għall-assi tal-ħin u tlett analiżijiet suċċessivi tas-C_f magħmula fuq kampjuni meħuda fl-intervalli ta' mill-inqas jumejn huma fi ħdan ± 20 % minn xulxin, u ma hemmx żieda sinifikanti ta' C_f fil-ħin bejn l-ewwel u l-aħħar analiżi suċċessivi. Meta jiġu analizzati l-kampjuni miġbura flimkien, hemm bżonn ta' mill-inqas erba' analiżijiet suċċessivi. Għas-sustanzi tat-test li jittieħdu bil-mod, ikun aktar xieraq li l-intervalli jkunu ta' sebat ijiem.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) ma jinbidilx b'mod sinifikanti tul perjodu mġedded ta' żmien, bil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-medium li jiċċirkundaha li tibqa' kostanti tul dan il-perjodu ta' żmien (ara d-Definizzjoni ta' stat stazzjonarju).

Il-karbonju organiku totali (TOC) huwa kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbonju li joriġina mis-sorsi organiċi kollha fil-media tat-test, inklużi sorsi partikulati u dissolti.

Il-kostant tar-rata ta' teħid (k_1) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'ħut tat-test jew fuqu (jew tessuti speċifiċi tiegħu) meta l-ħut ikun espost għal dik is-sustanza (k_1 huwa espress f'l kg^{-1} jum^{-1}).

Sustanzi b'kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti ta' reazzjoni kumplessa u Materjali bijoloġiċi huma magħrufin bħala UVCB

▼**M7**

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

TAGĦRIF

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) Il-Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness,*Koeffiċjent ta' Partizzjoni (n-ottanol/ilma): Metodu tat-Tħawwid tal-Flask*

(3) Il-Kapitolu A.24 ta' dan l-Anness, *Koeffiċjent ta' Partizzjoni (n-ottanol/ilma), Metodu HPLC*.

(4) Il-Kapitolu A.23 ta' dan l-Anness, *Koeffiċjent ta' Partizzjoni (1-Ottanol/Ilma): Metodu ta' Tħawwid bil-Mod*.

▼**M7**

Appendiċi 2

ĊERTI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TA' DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI

Komponent	Konċentrazzjonijiet limitu
Materja partikolata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organoklorurati totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromu	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Ħadid	1 µg/l
Ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

▼M7

Appendiċi 3

SPEĊIJIET TA' HUT RAKKOMANDATI GĦALL-ITTESTJAR

Speċijiet rakkomandati	Medda rakkomandata għat-temperatura tat-test (°C)	It-tul totali rakkomandat tal-annimal tat-test (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Żebra	20 – 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Karpjun buras	20 – 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karpjun komuni	20 – 25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) Medaka	20 – 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Gapi	20 – 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Dott tal-misluta blu	20 – 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Trota qawsalla	13 – 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Spinarell	18 – 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Ta' min jgħid li fit-test innifsu, il-piż huwa ppreferut bħala l-kejl għad-derivazzjonijiet tad-daqs u tal-kostant tar-rata ta' tkabbir. Madankollu, huwa rikonoxxut li t-tul huwa kejl iktar prattiku jekk il-ħut irid jingħażel fuq l-għajnejn fil-bidu ta' esperiment (jiġifieri mill-popolazzjoni tal-istokk).

(3) Din il-medda ta' tul hija indikata fil-Metodi ta' Ttestjar għal Sustanzi Kimiċi Ġodda eċċ. fuq il-bażi tal-Liġi tal-Ġappun dwar il-Kontroll tas-Sustanzi Kimiċi (CSCL).

Hemm diversi speċijiet tal-ilma salmura u marittimi li ntużaw inqas spiss, pereżempju:

Taqtuqa tat-tebgħa (*Leiostomus xanthurus*)

Karpjun tas-snien varjegati (*Cyprinodon variegatus*)

Menidja tal-marea (*Menidia beryllina*)

Dott fiddien (*Cymatogaster aggregata*)

Barbun Ingliż (*Parophrys vetulus*)

Skorfna korazzata (*Leptocottus armatus*)

Spinarell (*Gasterosteus aculeatus*)

Spnotta (*Dicentracus labrax*)

Karpjun ta' Al Bura (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Il-ħut tal-ilma ħelu mniżżel fit-tabella ta' hawn fuq huwa faċli biex jittrabba u/jew jinstab b'mod komuni matul is-sena, filwaqt li d-disponibbilità tal-ispeċijiet marittimi u tal-ilma salmura huwa parzjalment limitat għall-pajjiżi rispettivi. Huwa kapaċi jitrabba u jiġi kkultivat f'farms tal-ħut jew fil-laboratorju, f'kundizzjonijiet ikkontrollati għal kontra l-mard u l-parasiti, sabiex l-annimal tat-test ikun b'saħħtu u b'parentela magħrufa. Dan il-ħut huwa disponibbli f'bosta bnadi tad-dinja.

TAGĦRIF

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Appendiċi 4

SKEDI TAL-KAMPJUNAR GĦAL TESTIJIET TAL-ESPONIMENT MILWIEM U DJETETIKU

1. **Eżempju teoriku ta' skeda tal-kampjunar għal test sħiħ tal-bijokonċentrazzjoni b'esponiment milwiem ta' sustanza b'log K_{OW} = 4.**

Kampjunar tal-Ħut	Skeda tal-ħin tal-kampjun		Nru ta' kampjuni tal-ilma (1)	Nru ta' ħut għal kull kampjun (1)
	Frekwenza minima meħtieġa (jiem) (2)	Kampjunar addizzjonali (jiem) (2)		
Faża ta' Teħid				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 (5)
				(3 (6))
Faża ta' tisfija				Trasferiment tal-ħut f'ilma ħieles mis-sustanza tat-test
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 – 8 (5)
		17,5		(4 + 3 (6))
TOTAL				40 – 72 (48 – 80) (5)

(1) Il-valuri fil-parentesi huma numri ta' kampjuni (ilma, ħut) li għandhom jittieħdu jekk isir iktar kampjunar.

(2) L-istima ta' qabel it-test tal-k_2 għal log K_{OW} ta' 4,0 hija ta' 0,652 jiem^{-1}. Id-durata totali tal-esperiment hija stabbilita għal 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 jiem, jiġifieri 14-il jum. Għall-istiam tat-t_{SS} irreferi għall-Appendiċi 5.

(3) Teħid ta' kampjun tal-ilma wara li jiġu forniti tal-inqas 3 "volumi ta' kompartiment".

(4) Jittieħed kampjun ta' dan il-ħut mill-popolazzjoni tal-istokk.

(5) Jekk ikun hemm bżonn ta' preċiżjoni ikbar jew studji dwar il-metaboliżmu li jeħtieġu iktar ħut, dawn għandhom jiġu kampjunati b'mod partikolari fi tmiem il-fażijiet ta' teħid u tisfija (ara l-paragrafu 40).

(6) Jista' jkun hemm bżonn ta' tal-inqas 3 ħutiet oħran għall-analiżi tal-kontenut lipidu jekk ma jkunx possibbli li jintuża l-istess ħut kampjunat għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza fil-bidu tat-test, tmiem il-faża ta' teħid u tmiem il-faża ta' tisfija. Kun af li f'ħafna każijiet għandu jkun possibbli li jintużaw 3 ħutiet tal-kontroll biss (ara l-paragrafu 56).

▼M7

2. **Eżempju teoriku tal-iskeda tal-kampjunar għat-test tal-bijoakkumulazzjoni djetetika tas-sustanza wara fażijiet ta' 10 ijiem teħid u 42 jum tisfija.**

Okkażjoni tal-kampjunar	Skeda tal-ħin tal-kampjun		Nru ta' kampjuni tal-ikel	Nru ta' ħut għal kull kampjun	
	Jum tal-faži	Kampjuni addizzjonali tal-ħut?		Grupp tat-Test	Grupp tal-Kontroll
Faži ta' Teħid					
1	0	Possibbli ([1]) ([2])	3 — grupp tat-test	0	5 – 10
			3 — grupp tal-kontroll ([1])		(8 – 13) ([2])
1A ([3])	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Iva ([4])	3 — grupp tat-test	10 – 15 ([4])	5 – 10
			3 — grupp tal-kontroll ([1])	(13 – 18) ([5])	(8 – 13) ([5])
Faži ta' tisfija					
3	1	Iva ([4])		10 – 15 ([4])	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Iva ([4])		10 – 15 ([4])	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Iva ([4])		10 – 15 ([4]) (13 – 18) ([5])	5 – 10 (8 – 13) ([5])
TOTAL				59 – 120 (63 – 126) ([4]) ([5])	50 – 110 (56 – 116) ([4]) ([5])

([1]) 3 kampjuni ta' għalf mill-gruppi tal-kontroll u tat-test analizzati għal konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u għal kontenut lipidu.

([2]) Jittieħed kampjun tal-ħut mill-popolazzjoni tal-istokk fl-iktar żmien qrib l-istudju possibbli; għandu jittieħed kampjun ta' tal-inqas 3 ħutiet mill-popolazzjoni tal-istokk fil-bidu tat-test għall-kontenut lipidu.

([3]) Kampjunar (mhux obbligatorju) bikri fil-faži ta' teħid jipprovdi dejta sabiex tiġi kkalkolata l-assimilazzjoni djetetika tas-sustanza tat-test li tista' titqabbel mal-effiċjenza tal-assimilazzjoni kkalkolata mid-dejta tal-faži ta' tisfija.

([4]) Jista' jittieħed kampjun ta' 5 ħutiet oħrajn għal analiżi speċifika għat-tessut.

([5]) Jista' jkun hemm bżonn ta' tal-inqas 3 ħutiet oħran għall-analiżi tal-kontenut lipidu jekk ma jkunx possibbli li jintuża l-istess ħut kampjunat għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza fil-bidu tat-test, tmiem il-faži ta' teħid u tmiem il-faži ta' tisfija. Kun af li f'ħafna każijiet għandu jkun possibbli li jintużaw 3 ħutiet tal-kontroll biss (ara l-paragrafi 56 u 153).

Nota dwar il-faži u ż-żmien tal-kampjunar: Il-faži ta' teħid tibda bl-ewwel tagħlif ta' ikel miżjud. Jum tal-esperiment jibda mit-tagħlif sa ftit qabel it-tagħlif li jmiss, 24 siegħa wara. L-ewwel okkażjoni ta' kampjunar (1 fit-tabella) għandha tiġi ftit qabel l-ewwel tagħlif (eż. siegħa). Il-kampjunar matul studju idealment għandu jsir ftit qabel it-tagħlif tal-għada (jiġifieri madwar 23 siegħa wara t-tagħlif tal-jum tal-kampjunar). Il-faži ta' teħid tintemm ftit qabel l-ewwel tagħlif b'dieta mhux miżjuda, meta tibda l-faži ta' tisfija (huwa probabbli li l-ħut tal-grupp tat-test ikun għadu qiegħed jiddiġerixxi għalf miżjud fl-24 siegħa ta' wara l-aħħar tagħlif ta' dieta miżjuda). Dan ifisser li l-kampjun ta' tmiem it-teħid għandu jittieħed ftit qabel l-ewwel tagħlif b'dieta mhux miżjuda u l-ewwel kampjun tal-faži ta' tisfija għandu jittieħed madwar 23 siegħa wara l-ewwel tagħlif b'għalf mhux miżjud.

▼M7

Appendiċi 5

KALKOLI ĠENERALI

1. Introduzzjoni

2. Tbassir tad-durata tal-fażi ta' teħid

3. Tbassir tad-durata tal-fażi ta' tisfija

4. Metodu sekwenzjali: determinazzjoni tal-kostant tar-rata ta' tisfija (telf) k_2

5. Metodu sekwenzjali: determinazzjoni tal-kostant tar-rata ta' *teħid* k_1 (metodu tal-esponiment milwiem biss)

6. Mudell simultanju għall-kalkolu tal-kostanti tar-rati ta' teħid u tisfija (telf) (metodu tal-esponiment milwiem biss)

7. Korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir għall-BCF u l-BMF kinetiċi

8. Normalizzazzjoni għal-lipidu għal kontenut lipidu ta' 5 % (metodu tal-esponiment milwiem biss)

1. INTRODUZZJONI

Il-mudell tal-bijoakkumulazzjoni akkwatika ġenerali fil-ħut jista' jiġi deskritt f'termini tal-proċessi ta' teħid u telf, filwaqt li jiġi injorat it-teħid mal-ikel. L-ekwazzjoni differenzjali (d_{Cf}/dt) li tiddeskrivi r-rata ta' bidla fil-konċentrazzjoni fil-ħut (mg · kg^{-1}·jum^{-1}) tinkiseb bi (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.1]}$$

Fejn

k_1 = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għat-teħid fil-ħut (l · kg^{-1}·jum^{-1}).

k_2 = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għat-tisfija mill-ħut (jum^{-1}).

k_g = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għat-tkabbir tal-ħut ("dilwizzjoni tat-tkabbir") (jum^{-1}).

k_m = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għat-trasformazzjoni metabolika (jum^{-1})

k_e = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għall-eġestjoni tar-rawt (jum^{-1})

C_w = Konċentrazzjoni fl-ilma (mg · l^{-1}).

C_f = Konċentrazzjoni fil-ħut (mg · kg^{-1} piż niedi).

Għal sustanzi bijoakkumulanti, jista' jkun mistenni li medja ponderata għall-ħin (TWA) hija l-iktar konċentrazzjoni tal-esponiment rilevanti fl-ilma (C_w) fi ħdan il-medda awtorizzata ta' fluttwazzjoni (ara l-paragrafu 24). Huwa rakkomandat li tiġi kkalkolata konċentrazzjoni tal-ilma TWA, skont il-proċedura tal-Appendiċi 6 tat-TM C.20 (2). Ta' min jgħid li l-In-trasformazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-ilma hija xierqa meta jkun mistenni li sseħħ diżintegrazzjoni esponenzjali bejn il-perjodi ta' tiġdid, eż. f'disinn tat-test semistatiku. F'sistema bi fluss kontinwu, jaf ma jkunx hemm bżonn ln-trasformazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-esponiment. Jekk jinkisbu l-konċentrazzjonijiet tal-ilma TWA, dawn għandhom jiġu rrapportati u jintużaw f'kalkoli sussegwenti.

F'test tal-BCF standard fuq il-ħut, it-teħid u t-tisfija jistgħu jiġu deskritti f'termini ta' żewġ proċessi kinetiċi tal-ewwel ordni.

▼M7

$$Rate\ of\ uptake = k_1 \times C_w \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.2]}$$

$$Overall\ loss\ rate = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.3]}$$

Fi stat stazzjonarju, jekk jiġu supponuti tkabbir u metaboliżmu negliġibbli (jiġifieri l-valuri għal k_g u k_m ma jistgħux jiġu distinti minn żero), ir-rata ta' teħid tilħaq ir-rata ta' tisfija, u b'hekk it-tagħqid tal-Ekwazzjoni A5.2 u l-Ekwazzjoni A5.3 jagħti r-relazzjoni li ġejja:

$$BCF = \frac{C_{f\,-SS}}{C_{w\,-SS}} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.4]}$$

Fejn

$C_{f\text{-}SS}$ = Konċentrazzjoni fil-ħut fi stat stazzjonarju (mg kg^{-1} piż niedi).

$C_{w\text{-}SS}$ = Konċentrazzjoni fl-ilma fi stat stazzjonarju (mg l^{-1}).

Il-proporzjon ta' k^1/k_2 huwa l-BCF kinetiku (BCF_K) u għandu jkun daqs il-BCF fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) miksub mill-proporzjon tal-konċentrazzjoni fi stat stazzjonarju fil-ħut għal dik fl-ilma, iżda jista' jkun hemm devjazzjonijiet jekk l-istat stazzjonarju kien inċert jew jekk ġew applikati korrezzjonijiet għat-tkabbir għall-BCF kinetiku. Madankollu, peress li k_1 u k_2 huma kostanti, l-istat stazzjonarju ma għandux bżonn jintlaħaq sabiex jinkiseb BCF_K.

Fuq il-bażi ta' dawn l-ekwazzjonijiet tal-ewwel ordni, dan l-Appendiċi 5 jinkludi l-kalkoli ġenerali meħtieġa kemm għal metodi ta' bijoakkumulazzjoni tal-esponiment milwiem kif ukoll djetetiku. Madankollu, is-sezzjonijiet 5, 6 u 8 huma rilevanti biss għall-metodu tal-esponiment milwiem iżda huma inklużi hawnhekk peress li huma tekniki "ġenerali". Il-metodi sekwenzjali (sezzjonijiet 4 u 5) u simultanji (sezzjoni 6) jippermettu li jiġu kkalkolati l-kostanti ta' teħid u tisfija li jintużaw sabiex jinkisbu l-BCFs kinetiċi. Il-metodu sekwenzjali għad-determinazzjoni tal-k_2 (sezzjoni 4) huwa importanti għall-metodu djetetiku peress li huwa meħtieġ sabiex jiġu kkalkolati l-effiċjenza tal-assimilazzjoni kif ukoll il-BMF. L-Appendiċi 7 jispjega l-kalkoli li huma speċifiċi għall-metodu djetetiku.

2. TBASSIR TAD-DURATA TAL-FAŻI TA' TEĦID

Qabel ma jsir it-test, stima tal-k_2 u, b'hekk, ċertu perċentwal tal-ħin meħtieġ sabiex jintlaħaq stat stazzjonarju jistgħu jinkisbu mir-relazzjonijiet empiriċi bejn il-k_2 u l-koeffiċjent ta' partizzjoni *n*-ottanol/ilma (K_{OW}) jew k_1 u BCF. Madankollu, ta' min jgħid li l-ekwazzjonijiet f'din is-sezzjoni japplikaw biss meta t-teħid u t-tisfija jsegwu kinetika tal-ewwel ordni. Jekk jidher ċar li dan mhuwiex il-każ, huwa rakkomandat li jitfittex parir mingħand espert fil-bijostatistika u/jew fil-farmakokinetika, jekk wieħed ikun jixtieq tbassiriet tal-faži ta' teħid.

Stima tal-k_2 (jum^{-1}) tista' tinkiseb b'bosta metodi. Pereżempju, għall-ewwel jistgħu jintużaw ir-relazzjonijiet empiriċi li ġejjin [1]:

$$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 log K_{OW} \qquad (r^2 = 0{,}95)\ \text{[(3); Ekwazzjoni A5.5]}$$

jew

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.6]}$$

Fejn $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (għal sustanzi b'log $K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); Ekwazzjoni A5.7]

[1] Bħal b'kull relazzjoni empirika, għandu jiġi verifikat li s-sustanza tat-test taqa' fi ħdan id-dominju ta' applikabilità tar-relazzjoni

▼M7

U $BCF = 10^{(0,910 \cdot logK_{OW} - 1,975 \cdot log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0,786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); Ekwazzjoni A5.8]

W = piż medju tal-ħut tat-trattament (grammi piż niedi) fi tmiem it-teħid/bidu tat-tisfija ([1])

Għal relazzjonijiet oħrajn, ara (6). Jista' jkun ta' vantaġġ li jintużaw mudelli iktar ikkumplikati fl-istima tal-k_2 jekk, pereżempju, ikun probabbli li jista' jseħħ metaboliżmu sinifikanti (7) (8). Madankollu, iktar ma tiżdied il-kumplessità tal-mudell, iktar wieħed għandu joqgħod attent fl-interpretazzjoni tat-tbassiriet. Pereżempju, il-preżenza ta' gruppi nitro tista' tindika metaboliżmu veloċi, iżda dan mhuwiex dejjem il-każ. Għalhekk, l-utent għandu jiżen ir-riżultati tal-metodu tat-tbassir kontra l-istruttura kimika u kwalunkwe informazzjoni rilevanti oħra (pereżempju studji prelimianri) fl-iskedar ta' studju.

Iż-żmien sabiex jintlaħaq ċertu perċenwal ta' stat stazzjonarju jista' jinkiesb, billi tiġi applikata l-istima tal-k_2, mill-ekwazzjoni kinetika ġenerali li tiddeskrivi t-teħid u t-tisfija (kinetika tal-ewwel ordni), jekk jiġi supponut li t-tkabbir u l-metaboliżmu jkunu negliġibbli. Jekk iseħħ tkabbir sostanzjali matul l-istudju, l-istimi deskritti hawn taħt ma jibqgħux affidabbli. F'dawn il-każijiet, aħjar li jintuża k_{2g} ikkoreġut għat-tkabbir kif deskritt iktar tard (ara s-Sezzjoni 7 ta' dan l-Appendiċi):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.9]}$$

jew, jekk C_w huwa kostant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.10]}$$

Meta joqrob l-istat stazzjonarju ($t \rightarrow \infty$), l-Ekwazzjoni A5.10 (ara (9) (10)) tista' titnaqqas għal:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.11]}$$

jew

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.12]}$$

Il-BCF × C_w huwa approssimazzjoni għall-konċentrazzjoni fil-ħut fi stat stazzjonarju ($C_{f\text{-}SS}$). [Nota: jista' jintuża l-istess approċċ meta jiġi stmat BMF fi stat stazzjonarju bit-test djetetiku. F'dan il-każ, il-BCF huwa sostitwit mal-BMF u C_w ma' C_{food}, il-konċentrazzjoni fl-ikel, fl-ekwazzjonijiet ta' hawn fuq]

L-Ekwazzjoni A5.10 tista' tkun traskritta għal:

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.13]}$$

jew

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.14]}$$

Bl-applikazzjoni tal-Ekwazzjoni A5.14, il-ħin sakemm jintlaħaq ċertu perċentwal ta' stat stazzjonarju jista' jitbassar meta k_2 jiġi stmat minn qabel bl-Ekwazzjoni A5.5 jew l-Ekwazzjoni A5.6.

Bħala linja ta' gwida, l-aħjar durata statistika tal-faži ta' teħid għall-produzzjoni ta' dejta statistikament aċċettabbli (BCF_K) hija dak il-perjodu li huwa meħtieġ għall-kurva tal-logaritma tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut plottjata

([1]) Il-piż tal-ħut fi tmiem il-faži ta' teħid jista' jiġi stmat mid-dejta minn studji jew għarfien preċedenti taż-żieda probabbli fid-daqs tal-ispeċi tat-test minn piż tal-bidu tipiku tat-test tul durata tipika tat-teħid (eż. 28 jum).

▼M7

kontra l-ħin lineari sabiex jintlaħaq tal-inqas 50 % tal-istat stazzjonarju (jiġifieri $0,69/k_2$), iżda mhux iktar minn 95 % tal-istat stazzjonarju (jiġifieri $3,0/k_2$) (11). F'każ li l-akkumulazzjoni titla' għal iktar minn 95 % tal-istat stazzjonarju, il-kalkolu ta' BCF_{SS} isir fattibbli.

Il-ħin sabiex jintlaħaq 80 % tal-istat stazzjonarju huwa (bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.15]}$$

jew

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.16]}$$

B'mod simili, il-ħin sabiex jintlaħaq 95 fil-mija tal-istat stazzjonarju huwa:

$$t_{95} = \frac{-ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.17]}$$

Pereżempju, id-durata tal-faži ta' teħid (jiġifieri l-ħin sabiex jintlaħaq ċertu perċentwal ta' stat stazzjonarju, eż. t_{80} jew t_{95}) għal sustanza tat-test b'log K_{OW} = 4 tkun (bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.5, l-Ekwazzjoni A5.16 u l-Ekwazzjoni A5.17):

$$logk_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ jum}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \; days(59hours)$$

jew $t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \; days(110hours)$

Inkella, l-espressjoni:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \; (hours) \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.18]}$$

tista' tintuża sabiex jiġi kkalkolat il-ħin sabiex jintlaħaq stat stazzjonarju effettiv (t_{eSS}) (12). Għal sustanza tat-test b'log K_{OW} = 4 dan jirriżulta fi:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \; hours$$

3. TBASSIR TAD-DURATA TAL-FAŻI TA' TISFIJA

Tbassir taż-żmien meħtieġ sabiex jitnaqqas it-toqol fil-ġisem għal ċertu perċentwal tal-konċentrazzjoni inizjali jista' jinkiseb mill-ekwazzjoni ġenerali li tiddeskrivi t-teħid u t-tisfija (jekk tiġi supponuta kinetika tal-ewwel ordni, ara l-Ekwazzjoni A5.9 (1) (13).

Għall-faži ta' tisfija, huwa supponut li C_w (jew C_{food} għat-test djetetiku) hija żero. Imbagħad l-ekwazzjoni tista' titnaqqas għal:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.19]}$$

jew

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.20]}$$

fejn $C_{f,0}$ hija l-konċentrazzjoni fil-bidu tal-perjodu ta' tisfija.

imbagħad tintlaħaq tisfija ta' 50 fil-mija fil-ħin (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

jew

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

B'mod simili, tisfija ta' 95 fil-mija sejra tintlaħaq fi:

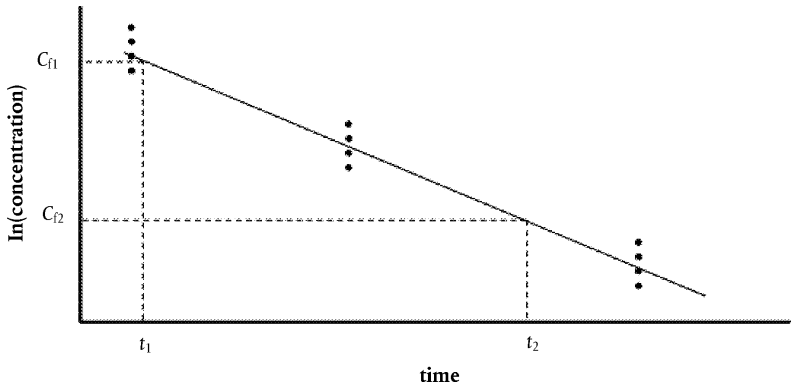
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Jekk jintuża teħid ta' 80 % għall-ewwel perjodu ($1{,}6/k_2$) u telf ta' 95 % fil-faži ta' tisfija ($3{,}0/k_2$), il-faži ta' tisfija tkun madwar id-doppju tad-durata tal-faži ta' teħid.

Kun af li l-istimi huma bbażati fuq is-suppożizzjoni li x-xejriet ta' teħid u tisfija sejrin isegwu l-kinetika tal-ewwel ordni. Jekk ikun ovvju li mhijiex segwita l-kinetika tal-ewwel ordni, dawn l-istimi ma jkunux validi.

4. METODU SEKWENZJALI: DETERMINAZZJONI TAL-KOSTANT TAR-RATA TA' TISFIJA (TELF) K_2

Ħafna mid-dejta dwar il-bijokonċentrazzjoni ġiet supponuta bħala deskritta "raġonevolment" tajjeb b'sempliċi mudell b'żewġ kompartimenti/żewġ parametri, kif indikat mill-kurva rettilineari li tqarreb għall-punti għall-konċentrazzjonijiet fil-ħut (f'In skala), matul il-faži ta' tisfjia.



Kun af li d-devjazzjonijiet minn linja dritta jistgħu jindikaw xejra ta' tisfija iktar kumplessa mill-kinetika tal-ewwel ordni. Il-metodu grafiku jista' jiġi applikat sabiex ikunu riżolti tipi ta' tisfija li jiddevjaw mill-kinetika tal-ewwel ordni.

Sabiex jiġi kkalkolat il-k_2 għall-punti ta' ħin multipli (ta' kampjunar), agħmel rigressjoni lineari tal-ln(konċentrazzjoni) kontra l-ħin. Il-pendil tal-linja ta' rigressjoni huwa stima tal-kostant tar-rata ta' tisfija k_2 ([1]). Mill-interċetta faċilment tista' tiġi kkalkolata l-konċentrazzjoni medja fil-ħut fil-bidu tal-faži ta' tisfija ($C_{0,d}$; li hija daqs il-konċentrazzjoni medja fil-ħut fi tmiem il-faži ta' teħid) (inklużi l-marġnijiet ta' żball) ([1]):

([1]) F'ħafna programmi li jippermettu rigressjoni lineari, jingħataw ukoll żbalji standard u intervall tal-kunfidenza (CI) tal-istimi, eż. fil-Microsoft Excel bl-użu tal-pakkett ta' għodod ta' Data Analysis.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{intercept}$$ [Ekwazzjoni A5.21]

Sabiex tikkalkola k_2 meta jkun hemm żewġ punti ta' ħin (tal-kampjunar) disponibbli (bħal fid-disinn minimizzat), issostitwixxi ż-żewġ konċentrazzjonijiet medji fl-ekwazzjoni li ġejja

$$k_2 = \frac{\ln(C_{fl}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1}$$ [Ekwazzjoni A5.22]

Meta $\ln(C_{f1})$ u $\ln(C_{f2})$ ikunu l-logaritmi naturali tal-konċentrazzjonijiet fil-ħinijiet t_1 u t_2, rispettivament, u t_2 u t_1 huma l-ħinijiet meta nġabru ż-żewġ kampjuni b'rabta mal-bidu tat-tisfija ([1]).

5. METODU SEKWENZJALI: DETERMINAZZJONI TAL-KOSTANT TAR-RATA TA' TEĦID K_1 (METODU TAL-ESPONIMENT MILWIEM BISS)

Sabiex issib valur għall-k[1] b'sett ta' dejta dwar il-konċentrazzjoni tal-ħin sekwenzjali għall-faži ta' teħid, uża programm tal-kompjuter sabiex tħaddem il-mudell li ġej:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t})$$ [Ekwazzjoni A5.23]

Fejn k_2 jinkiseb bil-kalkolu preċedenti, C_f (t) u C_w (t) huma l-konċentrazzjonijiet fil-ħut u l-ilma, rispettivament, fil-ħin t.

Sabiex tikkalkola k_1 meta jkun hemm żewġ punti ta' ħin (tal-kampjunar) biss disponibbli (bħal fid-disinn minimizzat), uża l-formula li ġejja:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})}$$ [Ekwazzjoni A5.24]

Meta k_2 jinkiseb bil-kalkolu preċedenti, C_f hija l-konċentrazzjoni fil-ħut fil-bidu tal-faži ta' tisfija, u C_w hija l-konċentrazzjoni medja fl-ilma matul il-faži ta' teħid ([2]).

Tista' ssir spezzjoni viżiva tal-pendili tal-k_1 u k_2 meta plottjati kontra d-dejta tal-punti tal-kampjun imkejla sabiex tiġi vvalutata l-idoneità tal-iffittjar. Jekk minn dan jirriżulta li l-metodu sekwenzjali ta stima ħażina għall-k_1, għandu jiġi applikat l-approċċ simultanju sabiex jiġu kkalkolati l-k_1 u l-k_2 (ara s-sezzjoni 6 li jmiss). Mill-ġdid, il-pendili li jirriżultaw għandhom jitqabblu mad-dejta mkejla plottjata għall-ispezzjoni viżiva tal-idoneità tal-iffittjar. Jekk l-iffittjar ikun għadu ħażin, dan jista' jkun indikazzjoni li l-kinetika tal-ewwel ordni ma tapplikax u li għandhom jintużaw mudelli oħrajn iktar kumplessi.

6. MUDELL SIMULTANJU GĦALL-KALKOLU TAL-KOSTANTI TAR-RATI TA' TEĦID U TISFIJA (TELF) (METODU TAL-ESPONIMENT MILWIEM BISS)

Jistgħu jintużaw programmi tal-kompjuter sabiex jinstabu l-valuri għal k_1 u k_2 b'sett ta' dejta dwar il-konċentrazzjoni tal-ħin sekwenzjali u l-mudell:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c$$ [Ekwazzjoni A5.25]

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c$$ [Ekwazzjoni A5.26]

fejn

t_c = il-ħin fi tmiem il-faži ta' teħid.

Dan l-approċċ jipprovdi direttament żbalji standard għall-istimi ta' k_1 u k_2. Meta k_1/k_2 jiġi sostitwit mill-BCF (ara l-Ekwazzjoni A5.4) fl-Ekwazzjoni A5.25 u l-Ekwazzjoni A5.26, l-iżball standard u s-CI ta' 95 % tal-BCF jistgħu

([1]) Għall-kuntrarju tal-metodu ta' rigressjoni lineari, l-użu ta' din il-formula mhuwiex sejjer irendi żball standard għall-k2.

([2]) Għall-kuntrarju tal-proċedura ta' ffittjar lineari, dan il-metodu normalment ma jrendix żball standard jew intervall ta' fiduċja għall-k1 stmat.

▼M7

jiġu stmati wkoll. Dan huwa partikolarment siewi meta jitqabblu stimi differenti minħabba t-trasformazzjoni tad-dejta. Il-varjabbli dipendenti (konċentrazzjoni tal-ħut) jista' jiġi ffittjat bl-ln trasformazzjoni jew mingħajr, u tista' tiġi evalwata l-inċertezza li tirriżulta tal-BCF.

Peress li teżisti korrelazzjoni b'saħħitha bejn iż-żewġ parametri k_1 u k_2 jekk jiġu stmati fl-istess ħin, jista' jkun rakkomandat li l-ewwel jiġi kkalkolat il-k_2 mid-dejta dwar it-tisfija biss (ara iktar 'il fuq); k_2 f'ħafna mill-każijiet jista' jiġi stmat mill-kurva ta' tisfija bi preċiżjoni relattivament kbira. Imbagħad ikun jista' jiġi kkalkolat il-k_1 mid-dejta dwar it-teħid bl-użu ta' rigressjoni mhux lineari ([1]). Huwa rakkomandat li tintuża l-istess trasformazzjoni tad-dejta meta jsir iffittjar sekwenzjali.

Tista' ssir spezzjoni viżiva tal-pendili li jirriżultaw meta plottjati kontra d-dejta tal-punti tal-kampjun imkejla sabiex tiġi vvalutata l-idoneità tal-iffittjar. Jekk minn dan jirriżulta li dan il-metodu ta stima ħażina għall-k_1, ikun jista' jiġi applikat l-approċċ simultanju sabiex jiġu kkalkolati l-k_1 u l-k_2. Mill-ġdid, il-mudell iffittjat għandu jitqabbel mad-dejta mkejla plottjata għall-ispezzjoni viżiva tat-tjubija tal-iffittjar u l-istimi tal-parametri li jirriżultaw għal k_1, k_2 u l-BCF li jirriżulta u l-iżbalji standard tagħhom u/jew l-intervalli ta' kunfidenza għandhom jitqabblu bejn tipi differenti ta' ffittjar.

Jekk l-iffittjar ikun ħażin, dan jista' jkun indikazzjoni li l-kinetika tal-ewwel ordni ma tapplikax u li għandhom jintużaw mudelli oħrajn iktar kumplessi. Waħda mill-iktar kumplikazzjonijiet komuni hija tkabbir tal-ħut matul it-test.

7. KORREZZJONI TAD-DILWIZZJONI TAT-TKABBIR GĦALL-BCF U L-BMF KINETIĊI

Din is-sezzjoni tiddeskrivi metodu standard għall-korrezzjoni minħabba t-tkabbir tal-ħut matul it-test (l-hekk imsejħa "dilwizzjoni tat-tkabbir") li huwa validu biss meta tkun tapplika kinetika tal-ewwel ordni. F'każ li jkun hemm indikazzjonijiet li ma tapplikax kinetika tal-ewwel ordni, huwa rakkomandat li jitfittex parir mingħand espert fil-bijostatistika għal korrezzjoni tajba tad-dilwizzjoni tat-tkabbir jew għall-użu tal-approċċ ibbażat fuq il-massa deskritt hawn taħt.

F'ċerti każijiet, dan il-metodu għall-korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir huwa soġġett għal nuqqas ta' preċiżjoni u kultant ma jaħdimx (pereżempju għal sustanzi b'tisfija bil-mod ħafna ttestjati f'ħut li jikber malajr, il-kostant tar-rata ta' tisfija derivat ikkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir, il-k_{2g}, jista' jkun żgħir ħafna u b'hekk l-errur fiż-żewġ kostanti tar-rati użati sabiex jinkiseb isir kritiku, u f'ċerti każijiet l-istimi tal-k_g jistgħu jkunu ikbar mill-k_2). F'dawn il-każijiet, jista' jintuża approċċ alternattiv (jiġifieri approċċ tal-massa), li jaħdem ukoll meta ma tkunx segwita kinetika tat-tkabbir tal-ewwel ordni, li jevita l-bżonn tal-korrezzjoni. Dan l-approċċ huwa spjegat fi tmiem din is-sezzjoni.

Metodu ta' tnaqqis tal-kostant tar-rata ta' tkabbir għall-korrezzjoni tat-tkabbir

Għall-metodu standard, id-dejta dwar il-piż u t-tul individwali kollha tiġi konvertita f'logaritmi naturali u ln(piż) jew ln(1/piż) jiġi plottjat vs iż-żmien (jum), b'mod separat għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Isir l-istess proċess għad-dejta mill-fażijiet ta' teħid u tisfija b'mod separat. Ġeneralment, għall-korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir, huwa iktar xieraq li tintuża d-dejta dwar il-piż mill-istudju sħiħ sabiex jinkiseb il-kostant tar-rata ta' tkabbir

([1]) Għandu jingħad li l-inċertezza fl-istima tal-k2 ma tintużax kif suppost fil-mudell ta' bijoakkumulazzjoni meta dan essenzjalment jitqies bħala kostant meta jiġi ffittjat il-k1 fil-metodu ta' ffittjar sekwenzjali. Għalhekk, l-inċertezza tal-BCF li tirriżulta sejra tkun differenti bejn il-metodi ta' ffittjar simultanji u sekwenzjali.

▼M7

(k_g), iżda differenzi statistikament sinifikanti bejn il-kostanti tar-rata ta' tkabbir derivati għall-fażi ta' teħid u l-fażi ta' tisfija jistgħu jindikaw li għandu jintuża l-kostant tar-rata tal-fażi ta' tisfija. Ir-rati ta' tkabbir kumplessivi għal studji milwiema għall-gruppi tat-test u tal-kontroll jistgħu jintużaw sabiex jiġi verifikat hemmx xi effett marbut mat-trattament.

Tiġi kkalkolata korrelazzjoni tal-inqas kwadri lineari għal-ln(piż tal-ħut) vs il-jum (u għal-ln(1/piż) vs il-jum) għal kull grupp (gruppi tat-test(ijiet) u tal-kontroll, dejta individwali, mhux valuri medji ta' kuljum) għall-istudju sħiħ, il-fażijiet ta' teħid u tisfija bl-użu ta' proċeduri statistiċi standard. Il-varjanzi fil-pendili tal-linji huma kkalkolati u jintużaw sabiex tiġi evalwata s-sinifikanza statistika (p = 0,05) tad-differenza fil-pendili (kostanti tar-rata ta' tkabbir) bl-użu tat-test-*t* ta' Student (jew ANOVA jekk jiġu ttestjati iktar minn konċentrazzjoni waħda). Ġeneralment hija ppreferuta dejta dwar il-piż għal finijiet ta' korrezzjoni tat-tkabbir. Id-dejta dwar it-tul, ittrattata bl-istess mod, tista' tkun siewja sabiex jitqabblu l-gruppi tal-kontroll u tat-test għal effetti relatati mat-trattament. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti fl-analiżi tad-dejta dwar il-piż, id-dejta dwar it-test u l-kontroll tista' tingħabar f'daqqa u jiġi kkalkolat kostant totali tar-rata ta' tkabbir tal-ħut għall-istudju (k_g) bħala l-pendil totali tal-korrelazzjoni lineari. Jekk jiġu osservati differenzi statistikament sinifikanti, il-kostanti tar-rata ta' tkabbir għal kull grupp tal-ħut, u/jew il-fażi ta' studju, jiġu rrapportati b'mod separat. Imbagħad, il-kostant tar-rata minn kull grupp tat-trattament għandu jintuża għall-finijiet ta' korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir ta' dak il-grupp. Jekk ġew osservati differenzi statistiċi bejn il-kostanti tar-rata tal-fażi ta' teħid u tisfija, għandhom jintużaw il-kostanti tar-rata ta' teħid tal-fażi ta' tisfija.

Il-kostant tar-rata ta' tkabbir ikkalkolat (k_g espress bħala jum^{-1}) jista' jitnaqqas mill-kostant totali tar-rata ta' tisfija (k_2) sabiex jinħareġ kostant tar-rata ta' tisfija, k_{2g}.

$$k_{2g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.27]}$$

Il-kostant tar-rata ta' teħid jiġi diviż bil-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir sabiex jinkiseb il-BCF kinetiku kkoreġut għat-tkabbir, il-BCF_{Kg} (jew BMF_{Kg}) denotat.

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.28]}$$

Il-kostant tar-rata ta' tkabbir derivat għal studju djetetiku jintuża fl-Ekwazzjoni A7.5 sabiex jiġi kkalkolat il-BMF_{Kg} ikkoreġut għat-tkabbir (ara l-Appendiċi 7).

Metodu bbażat fuq il-massa għall-korrezzjoni tat-tkabbir

Kif inhu spjegat hawn, tista' tintuża alternattiva għall-"metodu ta' tnaqqis tal-kostant tar-rata ta' tkabbir" imsemmi iktar 'il fuq li jevita l-ħtieġa ta' korrezzjoni għat-tkabbir. Il-prinċipju huwa li tintuża dejta dwar it-tisfija fuq bażi ta' massa għal ħut sħiħ minflok fuq bażi ta' konċentrazzjoni.

Ikkonverti l-konċentrazzjonijiet tat-tessut fil-fażi ta' tisfija (massa ta' sustanza tat-test/massa unitarja tal-ħut) f'massa ta' sustanza tat-test/ħut: qabbel il-konċentrazzjonijiet u l-piżijiet tal-ħut individwali f'forma ta' tabella (eż. fi spreadsheet fuq il-kompjuter) u mmoltiplika kull konċentrazzjoni bil-piż tal-ħut totali għal dak il-kejl sabiex toħroġ sett ta' sustanza tat-test tal-massa/ħut għall-kampjuni kollha tal-fażi ta' tisfija.

Ipplottja l-logaritma naturali li tirriżulta tad-dejta dwar il-massa tas-sustanza kontra ż-żmien għall-esperiment (fażi ta' tisfija) kif isir normalment.

▼M7

Għall-metodu tal-esponiment milwiem, ġib il-kostant tar-rata ta' teħid f'rutina (ara s-sezzjonijiet 4 u 6), kun af li għandu jintuża l-valur "normali" tal-k_2 fl-ekwazzjonijiet tal-iffittjar tal-kurva għal k_1) u oħroġ il-kostant tar-rata ta' tisfija mid-dejta ta' hawn fuq. Peress li l-valur li jirriżulta għall-kostant tar-rata ta' tisfija huwa indipendenti mit-tkabbir peress li nħareġ fuq il-bażi tal-massa għal kull ħuta sħiħa, dan għandu jiġi denotat bħala k_{2g} u mhux k_2.

8. NORMALIZZAZZJONI GĦAL-LIPIDU GĦAL KONTENUT LIPIDU TA' 5 % (METODU TAL-ESPONIMENT MILWIEM BISS)

Ir-riżultati tal-BCF (kinetiku u fi stat stazzjonarju) minn testijiet tal-esponiment milwiem għandu jiġi rrapportat ukoll b'rabta mal-kontenut lipidu tal-ħut prestabbilit ta' 5 % piż niedi, sakemm ma jkunx jista' jiġi argumentat li s-sustanza tat-test ma takkumulax primarjament f'lipidu (eż. ċerti sustanzi perfluworinati jistgħu jaqbdu mal-proteini). Id-dejta dwar il-konċentrazzjoni fil-ħut, jew il-BCF, trid tiġi kkonvertita f'bażi tal-piż niedi tal-kontenut lipidu ta' 5 %. Jekk intuża l-istess ħut għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza u l-kontenuti ta' lipidu fil-punti ta' kampjunar kollha, dan jeħtieġ li kull konċentrazzjoni mkejla individwali fil-ħut tiġi kkoreġuta għall-kontenut lipidu ta' dik il-ħuta.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.29]}$$

fejn

$C_{f,L}$ = konċentrazzjonijiet fil-ħut normalizzata għal-lipidu (mg kg^{-1} piż niedi)

L = frazzjoni ta' lipidu (abbażi tal-piż niedi)

C_f = konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut (mg kg^{-1} piż niedi)

Jekk l-analiżi tal-lipidu ma saritx fil-ħut kollu fil-kampjun, jintuża valur medju tal-lipidu sabiex jiġi normalizat il-BCF. Għall-BCF fi stat stazzjonarju, għandu jintuża l-valur medju rreġistrat fi tmiem il-fażi ta' teħid fil-grupp tat-trattament. Għan-normalizzazzjoni ta' BCF kinetiku, jista' jkun hemm xi bidliet li fihom ikun iġġustifikat li jittieħed approċċ differenti, pereżempju jekk il-kontenut lipidu jkun inbidel sew matul il-fażi ta' teħid jew tisfija. Madankollu, rata ta' tagħlif li tnaqqas kemm jista' jkun il-bidliet drammatiċi fil-kontenut lipidu għandha tintuża bħala rutina xorta waħda.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Ekwazzjoni A5.30]}$$

fejn

BCF_{KL} = BCF kinetiku normalizzat għal-lipidu (L kg^{-1})

L_n = frazzjoni medja ta' lipidu (abbażi tal-piż niedi)

BCF_K = BCF kinetiku (L kg^{-1})

TAGĦRIF

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

(2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna Reproduction Test*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Appendiċi 6

SEZZJONI TAL-EKWAZZJONI GĦAT-TEST TAL-ESPONIMENT MILWIEM: DISINN TAT-TEST MINIMIZZAT

Ir-raġuni wara dan l-approċċ hija li l-fattur ta' bijokonċentrazzjoni f'test sħiħ jista' jew jiġi stabbilit bħala fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) billi jiġi kkalkolat il-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-tessut tal-ħut għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma, jew billi jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) bħala l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' teħid k_1 għall-kostant tar-rata ta' tisfija k_2. Il-BCF_K huwa validu anki jekk ma tintlaħaqx konċentrazzjoni fi stat fiss ta' sustanza matul it-teħid, diment li t-teħid u t-tisfija jaġixxu bejn wieħed u ieħor skont il-proċessi tal-kinetika tal-ewwel ordni.

Jekk isir kejl tal-konċentrazzjoni tas-sustanza fit-tessuti (C_{f1}) meta jintemm l-esponiment (t_1) u l-konċentrazzjoni fit-tessut (C_{f2}) terġa' titkejjel wara li jgħaddi perjodu ta' żmien (t_2), ikun jista' jiġi stmat il-kostant tar-rata ta' tisfija (k_2) bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.22 mill-Appendiċi 5.

Imbagħad ikun jista' jiġi stabbilit b'mod alġebrajku l-kostant tar-rata ta' teħid, k_1, bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.23 mill-Appendiċi 5 (fejn C_f hija daqs $_{C}$f1 u t huwa daqs t_1) (1). B'hekk, il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika għad-disinn minimizzat (dežinjat bħala BCF_{Km} sabiex jintgħaraf mill-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika ddeterminati bl-użu ta' metodi oħrajn) huwa:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Ekwazzjoni A6.1]}$$

Il-konċentrazzjonijiet jew ir-riżultati għandhom jiġu kkoreġuti għad-dilwizzjoni tat-tkabbir u jiġu normalizzati għal kontenut lipidu tal-ħut ta' 5 %, kif inhu deskritt fl-Appendiċi 5.

Il-BCF_{SS} minimizzat huwa l-BCF ikkalkolat fi tmiem il-fażi ta' teħid, filwaqt li jiġi supponut li ntlaħaq stat stazzjonarju. Dan jista' jiġi supponut biss, għaliex in-numru ta' punti ta' kampjunar mhuwiex biżżejjed sabiex tingħata prova ta' dan).

$$\text{minimisedBCF}_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \qquad \text{[Ekwazzjoni A6.2]}$$

Fejn

$C_{f\text{-}minSS}$ = Konċentrazzjoni fil-ħut fi stat stazzjonarju supponut fi tmiem it-teħid (mg kg_{-1} piż niedi).

$C_{w\text{-}minSS}$ = Konċentrazzjoni fl-ilma fi stat stazzjonarju supponut fi tmiem it-teħid (mg l^{-1}).

TAGĦRIF

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Appendiċi 7

SEZZJONI TAL-EKWAZZJONI GĦAT-TEST TAL-ESPONIMENT DJETETIKU

1. Eżempju ta' kwantitajiet kostitwenti ta' ikel kummerċjali xieraq għall-ħut

2. Eżempji ta' teknika ta' żieda tas-sustanza mal-ikel

3. Kalkolu tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni u l-fattur ta' bijomanjifikazzjoni

4. Korrezzjoni għal-lipidu

5. Evalwazzjoni tad-differenzi bejn konċentrazzjoni mkejla fiż-żmien żero ($C_{0,m}$) u konċentrazzjoni derivata fil-ħin żero ($C_{0,d}$)

6. Gwida għal sustanzi tat-test b'tisfija veloċi ħafna

1. EŻEMPJU TA' KWANTITAJIET KOSTITWENTI TA' IKEL KUMMERĊJALI XIERAQ GĦALL-ĦUT

Kostitwent ewlieni	ħut mitħun
Proteina Mhux Raffinata	≤ 55,0 %
Xaħam mhux raffinat	≤ 15,0 % ([1])
Fibra Mhux Raffinata	≥ 2,0 %
Umdità	≥ 12 %
Irmied	≥ 8 %

([1]) F'ċerti reġjuni, jista' jkun possibbli biss li jinkiseb għalf tal-ħut b'konċentrazzjoni ta' lipidu li tkun inqas minn dan il-limitu superjuri. F'ċerti każijiet, għandhom isiru studji bil-konċentrazzjoni inferjuri ta' lipidu fl-ikel kif fornit, u r-rata tat-tagħlif tiġi aġġustata kif xieraq sabiex tinżamm is-saħħa tal-annimali. Il-lipidi tad-dieta ma għandhomx jiżdiedu b'mod artifiċjali b'żieda taż-żejt eċċessiv.

2. EŻEMPJI TA' TEKNIKA TA' ŻIEDA TAS-SUSTANZA MAL-IKEL

Punti Ġenerali

Id-dieti tal-kontroll għandhom jitħejjew bl-istess mod eżatt bħad-dieta miżjuda, iżda fin-nuqqas tas-sustanza tat-test.

Sabiex tiġi verifikata l-konċentrazzjoni tad-dieta ttrattata, għandhom jiġu estratti kampjuni triplikati tal-ikel dożat b'metodu ta' estrazzjoni xieraq u titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jew ir-radjuattività fl-estratti. Għandhom jintwerew irkupri ta' grad għoli (> 85 %) b'varjazzjoni baxxa bejn il-kampjuni (tliet konċentrazzjonijiet tal-kampjun għas-sustanza meħuda fil-bidu tat-test ma għandhomx ivarjaw b'iktar minn ± 15 % mill-medja).

Matul it-test djetetiku, għandhom jinġabru tliet kampjuni tad-dieta għall-analiżi fil-jum 0 u fi tmiem il-fażi ta' teħid sabiex jiġi stabbilit il-kontenut tas-sustanza tat-test fid-dieta.

Preparazzjoni tal-ikel tal-ħut b'materjal tat-test likwidu (pur)

Tiġi stabbilita konċentrazzjoni nominali fil-mira tat-test fl-ikel tal-ħut tat-trattament, pereżempju 500 μg sustanza tat-test/g ikel. Il-kwantità xierqa (skont il-massa molari jew ir-radjuattività speċifika) tas-sustanza tat-test pura tiżdied ma' massa magħrufa ta' ikel tal-ħut f'ġarra tal-ħġieġ jew bozza tal-evaporazzjoni rotatorja. Il-massa tal-ikel tal-ħut għandha tkun biżżejjed għad-durata tal-fażi ta' teħid (filwaqt li titqies il-ħtieġa ta' kwantitajiet ikbar f'kull għalf

▼M7

minħabba li jikber il-ħut). L-għalf tal-ħut/is-sustanza tat-test għandhom jitħalltu matul il-lejl b'tħawwid bil-mod (eż. bl-użu ta' roto-rack mixer jew b'rotazzjoni jekk tintuża bozza tal-evaporazzjoni rotatorja). Id-dieta miżjuda għandha tinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-istabilità tas-sustanza tat-test fi ħdan it-taħlita tal-għalf (eż. tkessiħ) sakemm tintuża.

Preparazzjoni tal-ikel tal-ħut b'veikolu taż-żejt tal-qamħirrum jew tal-ħut

Is-sustanzi solidi tat-test għandhom jintaħnu f'mehrież biex jiġu trab fin. Is-sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament maż-żejt tal-qamħirrum jew tal-ħut. Is-sustanza tat-test hija dissolta fi kwantità magħrufa ta' żejt tal-qamħirrum jew tal-ħut (eż. 5-15-il ml). Iż-żejt iddożat jiġi ttrasferit b'mod kwantitattiv f'bozza tal-evaporazzjoni rotatorja ta' qies xiearq. Il-flask użat għat-tħejjija taż-żejt iddożat għandu jitlaħlaħ b'żewġ alikwoti żgħar ta' żejt u dawn jiżdiedu fil-bozza sabiex jiġi żgurat li tiġi ttrasferita s-sustanza dissolta kollha tat-test. Sabiex tiġi żgurata dissoluzzjoni/dispersjoni sħiħa fiż-żejt (jew jekk tintuża iktar minn sustanza waħda tat-test fl-istudju), jiżdied mikroħawwad, jingħalaq il-flask u t-taħlita titħawwad b'mod rapidu matul il-lejl. Fil-bozza tiżdied kwantità xierqa ta' dieta tal-ħut (normalment fil-forma ta' gerbub) għat-test, u l-kontenuti tal-bozza jitħalltu b'mod omoġenju bil-qlib kontinwu tal-bozza tal-ħġieġ għal tal-inqas 30 minuta, iżda idealment matul il-lejl sħiħ. Għalhekk, l-ikel miżjud bis-sustanza jinħażen kif xieraq (eż. imkessaħ) sabiex tiġi żgurata stabilità fis-sustanza tat-test fl-ikel sakemm tintuża.

Preparazzjoni tal-ikel tal-ħut b'solvent organiku

Kwantità xierqa tas-sustanza tat-test (b'massa molari jew radjuattività speċifika) biżżejjed sabiex tintlaħaq id-doża fil-mira tiġi dissolta f'solvent organiku xieraq (eż. ċikloessan jew aċeton; 10-40 ml, iżda volum ikbar jekk ikun hemm bżonn, skont il-kwantità tal-ikel li miegħu trid tiżdied is-sustanza). Alikwota ta' din is-soluzzjoni, jew kollha kemm hi (miżjuda skont il-porzjon), titħallat mal-massa xierqa ta' ikel tal-ħut li tkun biżżejjed sabiex it-test jilħaq il-livell nominali meħtieġ tad-doża. L-ikel/is-sustanza tat-test jistgħu jitħalltu fi skutella tat-taħlit tal-azzar inossidabbli u l-ikel tal-ħut iddożat frisk li jifdal fl-iskutella f'hood tal-laboratorju għal jumejn (jitħawwad kultant) sabiex is-solvent żejjed ikun jista' jevapora, jew jitħallat f'bozza b'evaporazzjoni rotatorja b'rotazzjoni kontinwa. Is-solvent żejjed jista' "jittajjar" taħt fluss ta' arja jew nitroġenu, jekk ikun hemm bżonn. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li s-sustanza tat-test ma tikkristallizzax hu u jitneħħa s-solvent. Id-dieta miżjuda għandha tinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-istabilità tas-sustanza tat-test fi ħdan it-taħlita tal-għalf (eż. tkessiħ) sakemm tintuża.

3. KALKOLU TAL-EFFIĊJENZA TAL-ASSIMILAZZJONI U L-FATTUR TA' BIJOMANJIFIKAZZJONI

Sabiex tiġi kkalkolata l-effiċjenza tal-assimilazzjoni, l-ewwel għandu jiġi stmat il-kostant totali tar-rata ta' tisfija skont is-sezzjoni 4 tal-Appendiċi 5 (bl-użu tal-"metodu sekwenzjali", jiġifieri rigressjoni lineari standard) bl-użu tal-konċentrazzjonijiet medji tal-kampjun mill-faża ta' tisfija. Il-kostant tar-rata ta' tagħlif, I, u d-durata tat-teħid, t, huma parametri magħrufin tal-istudju. C_{food}, il-konċentrazzjoni mkejla medja tas-sustanza tat-test fl-ikel hija varjabbli mkejla fl-istudju. $C_{0,d}$, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut fi tmeim il-faża ta' teħid, normalment tinkiseb mill-interċetta ta' plott ta' ln(konċentrazzjoni) vs il-jum tat-tisfija.

L-effiċjenza tal-assimilazzjoni tas-sustanza (a, l-assorbiment tas-sustanza tat-test fl-imsaren) tiġi kkalkolata bħala:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.1]}$$

fejn:

$C_{0,d}$ = il-konċentrazzjoni derivata fil-ħut fiż-żmien żero tal-faża ta' tisfija (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = il-kostant totali tar-rata ta' tisfija (mhux ikkoreġut għat-tkabbir) (jum^{-1}), ikkalkolat skont l-ekwazzjonijiet fl-Appendiċi 5, Sezzjoni 3;

I = il-kostant tar-rata ta' inġestjoni tal-ikel (g ikel g^{-1} ħut jum^{-1});

C_{food} = il-konċentrazzjoni fl-ikel (mg kg^{-1} ikel);

t = id-durata tal-perjodu tat-tagħlif (jum)

Madankollu, ir-rata ta' tagħlif, I, użata fil-kalkolu jaf ikollha bżonn tiġi aġġustata għat-tkabbir tal-ħut sabiex tagħti effiċjenza tal-assimilazzjoni preċiża, a. F'test li fih il-ħut jikber b'mod sinifikanti matul il-fażi ta' teħid (li fiha ma ssir ebda korrezzjoni tal-kwantitajiet ta' għalf sabiex tinżamm ir-rata ta' tagħlif stabbilita), ir-rata ta' tagħlif effettiva hi u tkompli l-fażi ta' teħid sejra tkun inqas minn dik stabbilita, u tirriżulta f'effiċjenza tal-assimilazzjoni "vera" ogħla. (Kun af li dan mhuwiex importanti għall-kalkolu tal-BMF totali peress li t-termini tal-I effettivament jgħibu bejn l-Ekwazzjoni A7.1 u l-Ekwazzjoni A7.4). Ir-rata ta' tagħlif medja kkoreġuta għad-dilwizzjoni tat-tkabbir, I_g, tista' tinkiseb b'bosta modi, iżda mod veloċi u rigoruż huwa li jintuża l-kostant magħruf tar-rata ta' tkabbir (k_g) sabiex jiġu stmati l-piżijiet tal-ħut tat-test fil-punti ta' żmien matul il-fażi ta' teħid, jiġifieri:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.2]}$$

fejn

$W_f(t)$ = piż medju tal-ħut fil-jum tat-teħid t

$W_{f,0}$ = piż medju tal-ħut fil-bidu tal-esperiment

B'dan il-mod (tal-inqas) jista' jiġi stmat il-piż medju tal-ħut fl-aħħar jum ta' esponiment ($W_{f,tmiem\ it\text{-}teħid}$). Peress li r-rata ta' tagħlif kienet stabbilita fuq il-bażi ta' $W_{f,0}$, ir-rata ta' tagħlif effettiva għal kull jum tat-teħid tista' tiġi kkalkolata bl-użu ta' dawn iż-żewġ valuri tal-piż. Imbagħad, ir-rata ta' tagħlif ikkoreġuta għat-tkabbir, I_g (g ikel g^{-1} ħut jum^{-1}), li għandha tintuża minflok I f'każijiet ta' tkabbir rapidu matul il-fażi ta' teħid, tista' tiġi kkalkolata bħala

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,end-of-uptake}} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.3]}$$

Ladarba tinkiseb l-effiċjenza tal-assimilazzjoni, il-BMF jista' jiġi kkalkolat billi tiġi moltiplikata bil-kostant tar-rata ta' tagħlif I (jew I_g, jekk tintuża sabiex tiġi kkalkolata α) u bid-diviżjoni tar-riżultat tal-moltiplikazzjoni bil-kostant totali tar-rata ta' tisfija k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.4]}$$

Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għat-tkabbir għandu jiġi kkalkolat bl-istess mod ukoll, bl-użu tal-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (kif derivat skont is-sezzjoni 7 fl-Appendiċi 5). Mill-ġdid, jekk intużat I_g sabiex tiġi kkalkolata α, din għandha tintuża hawnhekk ukoll minflok I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.5]}$$

fejn:

α = l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (l-assorbiment tas-sustanza tat-test fl-imsaren);

k_2 = il-kostant totali tar-rata ta' tisfija (mhux ikkoreġut għat-tkabbir) (jum^{-1}), ikkalkolat skont l-ekwazzjonijiet fl-Appendiċi 5, Sezzjoni 3;

▼M7

k_{2g} = kostant tar-rata ta' tisfija korrett għat-tkabbir (jum^{-1});

I = il-kostant tar-rata ta' inġestjoni tal-ikel (g ikel g^{-1} ħut jum^{-1});

In-nofs ħajja kkoreġuta għat-tkabbir ($t_{1/2}$) hija kkalkolata kif ġej.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.6]}$$

L-effiċjenza tal-assimilazzjoni tas-sustanza mid-dieta tista' tiġi stmata wkoll jekk ir-residwi tat-tessut jiġu stabbiliti matul il-fażi lineari tal-fażi ta' teħid (bejn jum u tlieta). F'dan il-każ, l-effiċjenza tal-assimilazzjoni tas-sustanza (α) tista' tiġi stabbilita kif ġej:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.7]}$$

Fejn

C_{fish} *(t)* = konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut fiż-żmien t (mg kg^{-1} piż niedi).

4. KORREZZJONI GĦAL-LIPIDU

Jekk il-kontenut lipidu tkejjel fl-istess ħuta bħall-analiżi kimika għall-intervalli ta' kampjunar kollha, il-konċentrazzjonijiet individwali għandhom jiġu kkoreġuti fuq il-bażi ta' lipidu u l-ln(konċentrazzjoni, ikkoreġuta għal-lipidu) tiġi pplottjata kontra t-tisfija (jum) sabiex jinħarġu $C_{0,d}$ u k_2. Imbagħad, l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (Ekwazzjoni A7.1) tista' tiġi kkalkolata fuq bażi lipida, bl-użu ta' C_{ikel} fuq bażi lipida (jiġifieri C_{ikel} tiġi moltiplikata bil-frazzjoni medja ta' lipidu tal-ikel). Il-kalkolu sussegwenti bl-użu tal-Ekwazzjoni A7.4 u l-Ekwazzjoni A7.5 sejjer jagħti l-BMF ikkoreġut għal-lipidu (u kkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir) direttament.

Inkella, il-fattur lipidu medju (w/w) fil-ħut u fl-ikel jinkiseb kemm għall-grupp tat-trattament kif ukoll tal-kontroll (għall-ikel u l-ħut tal-grupp tal-kontroll, normalment minn dejta mkejla fil-bidu u fi tmiem l-esponiment); għall-ħut tal-grupp tat-trattament, normalment minn dejta mkejla fi tmiem l-esponiment biss). F'ċerti studji, il-kontenut lipidu tal-ħut jista' jiżdied ħafna; f'dawn il-każijiet ikun iktar xieraq li tintuża konċentrazzjoni medja ta' lipidu fil-ħut tat-test ikkalkolata mill-valuri mkejlin fi tmiem l-esponiment u fi tmiem it-tisfija. B'mod ġenerali, dejta mill-grupp tat-trattament biss għandha tintuża sabiex jinkisbu ż-żewġ frazzjonijiet ta' lipidu.

Il-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu (L_c) huwa kkalkolat bħala:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.8]}$$

fejn $L_{\text{ħut}}$ u L_{ikel} huma l-frazzjonijiet medji ta' lipidu fil-ħut u l-ikel, rispettivament.

Il-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu jintuża sabiex jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għal-lipidu (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Ekwazzjoni A7.9]}$$

5. EVALWAZZJONI TAD-DIFFERENZI BEJN KONĊENTRAZZJONI MKEJLA FIŻ-ŻMIEN ŻERO ($C_{0,M}$) U KONĊENTRAZZJONI DERIVATA FIL-ĦIN ŻERO ($C_{0,D}$)

Il-konċentrazzjoni mkejla fiż-żmien żero ($C_{0,m}$) u l-konċentrazzjoni derivata fiż-żmien żero ($C_{0,d}$) għandhom jitqabblu. Jekk huma simili ħafna, dan jappoġġja l-mudell tal-ewwel ordni sabiex jinkisbu l-parametri ta' tisfija.

▼M7

F'ċerti studji, jista' jkun hemm differenza kbira bejn il-valur derivat fiż-żmien żero, $C_{0,d}$, u l-konċentrazzjoni medja mkejla fiż-żmien żero. $C_{0,m}$ (ara l-aħħar bullet tal-paragrafu 159 ta' dan il-metodu ta' ttestjar). F'każ li $C_{0,d}$ tkun ferm inqas minn $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), id-differenza tista' tissuġġerixxi l-preżenza ta' ikel miżjud mhux iddiġerit fl-imsaren. Dan jista' jiġi ttestjat b'mod sperimentali billi ssir analiżi separata fuq l-imsaren maqtugħin barra jekk ittieħdu iktar kampjuni (ta' ħut sħiħ) u dawn jinħażnu fi tmiem il-fażi ta' teħid. Inkella, jekk test tal-eċċezzjonijiet statistikament validu applikat għar-rigressjoni lineari tal-fażi ta' tisfija jindika li l-ewwel punt ta' kampjunar tat-tisfija huwa elevat b'mod żbaljat, jista' jkun xieraq li ssir ir-rigressjoni lineari sabiex jinkiseb k_2 iżda mingħajr l-ewwel punt ta' konċentrazzjoni tat-tisfija. F'dawn il-każijiet, jekk l-inċertezza fir-rigressjoni lineari titnaqqas ħafna, u jkun ċar li ġiet segwita bejn wieħed u ieħor il-kinetika tat-tisfija tal-ewwel ordni, jista' jkun xieraq li jintużaw il-valuri li jirriżultaw tal-$C_{0,d}$ u k_2 fil-kalkolu tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni. Dan għandu jkun iġġustifikat bis-sħiħ fir-rapport. Huwa possibbli wkoll li fil-fażi ta' tisfija kienet qiegħda topera kinetika mhux tal-ewwel ordni. Jekk dan huwa probabbli (jiġifieri d-dejta ttrasformata tal-logaritma naturali tidher li ssegwi kurva meta mqabbla mal-plott ta' rigressjoni lineari b'linja dritta), mhuwiex probabbli li l-kalkoli tal-k_2 u $C_{0,d}$ ikunu validi u għandu jitfittex il-parir ta' espert tal-bijostatistika.

Jekk $C_{0,d}$ hija ferm ogħla mill-valur imkejjel ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), dan jista' jindika: li s-sustanza ssaffiet malajr ħafna (jiġifieri l-punti ta' kampjunar qorbu lejn il-limitu ta' kwantifikazzjoni tal-metodu analitiku fi żmien ferm bikri fil-fażi ta' tisfija, ara s-Sezzjoni 6 ta' hawn taħt); li kien hemm devjazzjoni mill-kinetika tat-tisfija tal-ewwel ordni; li r-rigressjoni lineari sabiex jinkisbu k_2 u $C0$ fiha l-iżbalji; jew li seħħet problema bil-konċentrazzjonijiet imkejlin fl-istudju f'ċerti punti ta' żmien tal-kampjunar. F'każijiet bħal dawn, il-plott ta' rigressjoni lineari għandu jiġi skrutinizzat għall-evidenza ta' kampjuni fil-limitu ta' kwantifikazzjoni jew kważi, għal eċċezzjonijiet u għal kurvatura ovvja (li tissuġġerixxi kinetika mhux tal-ewwel ordni), u enfasizzati fir-rapport. Għandha tiġi deskritta u ġġustifikata kwalunkwe rievalwazzjoni sussegwenti tar-rigressjoni lineari sabiex jitjiebu l-valuri stmati. Jekk tiġi osservata devjazzjoni kbira mill-kinetika tal-ewwel ordni, mhuwiex probabbli li l-kalkoli tal-k_2 u $C_{0,d}$ ikunu validi u għandu jitfittex il-parir ta' espert tal-bijostatistika.

6. GWIDA GĦAL SUSTANZI TAT-TEST B'TISFIJA VELOĊI ĦAFNA

Kif ġie diskuss fil-paragrafu 129 tal-metodu ta' ttestjar, ċerti sustanzi jistgħu jissaffew tant malajr li ma jkunux jistgħu jinkisbu konċentrazzjoni affidabbli taż-żmien żero, $C_{0,d}$, u k_2 għaliex fil-kampjuni ferm bikrin fil-fażi ta' tisfija (jiġifieri mit-tieni kampjun ta' tisfija 'l quddiem), is-sustanza effettivament ma tibqax titkejjel (konċentrazzjonijiet irrapportati fil-limitu tal-kwantifikazzjoni). Din is-sitwazzjoni ġiet osservata fir-ringtest imwettaq b'appoġġ ta' dan il-metodu ta' ttestjar bil-benżo[a]piren, u ġiet iddokumentata fir-rapport ta' validazzjoni għall-metodu. F'dawn il-każijiet, ma tistax issir rigressjoni lineari affidabbli, u aktarx li din tagħti stima għolja wisq tas-$C_{0,d}$, li tirriżulta f'effiċjenza tal-assimilazzjoni apparenti ferm ikbar minn 1. Huwa possibbli li tiġi kkalkolata stima konservattiva tal-k_2 u BMF ta' "limitu superjuri" f'dawn il-każijiet.

Bl-użu ta' dawk il-punti ta' dejta tal-fażi ta' tisfija fejn tkejlet konċentrazzjoni, sa u inkluża l-ewwel konċentrazzjoni "mhux individwata" (konċentrazzjoni stabbilita fil-limitu tal-kwantifikazzjoni), rigressjoni lineari (bl-użu tad-dejta dwar il-konċentrazzjoni trasformata tal-logaritma naturali kontra ż-żmien) sejra tagħti stima tal-k_2. Għal dawn it-tipi ta' każijiet, aktarx li dan sejjer jinvolvi żewġ punti ta' dejta biss (eż. jiem 1 u 2 tal-kampjun tat-tisfija) u mbagħad ikun jista' jiġi stmat k_2 bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.22 fl-Appendiċi 5.

▼**M7**

Din l-istima tal-k_2 tista' tintuża sabiex tiġi stmata effiċjenza tal-assimilazzjoni skont l-ekwazzjoni A7.1, billi jiġi sostitwit il-valur ta' $C_{0,d}$ fl-ekwazzjoni mal-konċentrazzjoni mkejla fiż-żmien żero ($C_{0,m}$) f'każijiet fejn $C_{0,d}$ tkun stmata b'mod ċar bħala ferm ogħla minn dak li seta' jinkiseb fit-test. Jekk $C_{0,m}$ ma setgħetx titkejjel, għandu jintuża l-limitu ta' detezzjoni fit-tessut tal-ħut. Jekk, f'ċerti każijiet, dan jagħti valur ta' $\alpha > 1$, l-effiċjenza tal-assimilazzjoni hija supponuta bħala 1 bħala "l-agħar każ".

Imbagħad il-BMF_K massimu jista' jiġi stmat bl-użu tal-Ekwazzjoni A7.4, u għandu jiġi kkwotat bħala valur "ferm inqas minn" (<<). Pereżempju, għal studju mwettaq b'rata ta' tagħlif ta' 3 % u nofs ħajja tat-tisfija inqas minn 3 ijiem, u α "l-agħar każ" ta' 1, il-BMF_K aktarx li jkun inqas b'madwar 0.13. Fid-dawl tal-iskop ta' din l-istima u l-fatt li l-valuri, fl-għamla tagħhom, sejrin ikunu konservattivi, ma hemmx bżonn li jiġu kkoreġuti għad-dilwizzjoni tat-tkabbir jew il-kontenut lipidu tal-ħut u l-ikel.

▼M7

Appendiċi 8

APPROĊĊI SABIEX JIĠU STMATI L-BCFS TENTATTIVI MID-DEJTA MIĠBURA FL-ISTUDJU TAL-ESPONIMENT DJETETIKU

Il-metodu djetetiku huwa inkluż f'dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi li fil-prattika ma jistgħux jiġu ttestjati bl-użu tal-metodu tal-esponiment milwiem. Il-metodu tal-esponiment milwiem jagħti fattur ta' bijokonċentrazzjoni, filwaqt li l-metodu djetetiku jwassal direttament għal informazzjoni dwar il-potenzjal ta' bijomanjifikazzjoni tat-tagħlif. F'ħafna reġimi dwar is-sikurezza tas-sustanza kimika, hemm bżonn ta' informazzjoni dwar il-bijokonċentrazzjoni akkwatika (pereżempju fil-valutazzjoni tar-riskju u s-Sistema ta' Armonizzazzjoni Globalizzata tal-Klassifikazzjoni). B'hekk, hemm bżonn li tintuża d-dejta ġġenerata fi studju djetetiku sabiex jiġi stmat fattur ta' bijokonċentrazzjoni li huwa paragunabbli għal testijiet imwettqin skont il-metodu tal-esponiment milwiem ([1]). Din is-sezzjoni tixtarr approċċi li jistgħu jiġu segwiti biex isir hekk, filwaqt li tirrikonoxxi n-nuqqasijiet li huma inerenti fl-istimi.

L-istudju djetetiku jkejjel it-tisfija sabiex jagħti kostant tar-rata ta' tisfija, k_2. Jekk ikun jista' jiġi stmat kostant tar-rata ta' teħid bid-dejta disponibbli għas-sitwazzjoni fejn il-ħut kien espost għas-sustanza tat-test mill-ilma, ikun jista' jiġi stmat BCF kinetiku.

L-istima ta' kostant tar-rata ta' teħid għall-esponiment mill-ilma ta' sustanza tat-test hija msejsa fuq ħafna suppożizzjonijiet, u lkoll sejrin jikkontribwixxu għall-inċertezza tal-istima. Barra minn hekk, dan l-approċċ sabiex jiġi stmat BCF jassumi li r-rata totali ta' tisfija (inklużi fatturi kontributorji bħad-distribuzzjoni fil-ġisem u l-proċessi ta' tisfija individwali) huwa indipendenti mit-teknika ta' esponiment użata sabiex jiġi prodott toqol fil-ġisem tas-sustanza tat-test.

Is-suppożizzjonijiet ewlenin inerenti fl-approċċ tal-istima jistgħu jinġabru fil-qasir kif ġej.

It-tisfija wara t-teħid djetetiku hija l-istess bħat-tisfija wara l-esponiment milwiem għal sustanza partikolari

It-teħid mill-ilma jsegwi l-kinetika tal-ewwel ordni

Skont il-metodu użat sabiex jiġi stmat it-teħid:

— it-teħid jista' jiġi korrelatat mal-piż tal-ħut waħdu

— it-teħid jista' jiġi korrelatat mal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanza waħdu

— it-teħid jista' jiġi korrelatat ma' taħlita tal-piż tal-ħut mal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanza

— fatturi li jistgħu jaffettwaw it-teħid fi studju ta' esponiment milwiem fil-prattika bħall-bijodisponibbiltà tas-sustanza, l-adsorbiment mal-apparat, id-daqs molekolari, eċċ. ftit li xejn għandhom effett

— u, b'mod kruċjali:

Id-database (“sett ta' taħriġ” użata sabiex jiġi żviluppat il-metodu ta' stima tat-teħid tirrappreżenta s-sustanza kkunsidrata

Bosta pubblikazzjonijiet fit-tagħrif disponibbli ħarġu ekwazzjonijiet li rabtu t-teħid mill-ilma fil-ħut permezz tal-garġi mal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma ta' sustanza, il-piż tal-ħut (1) (2) (3) (4), il-volum u/jew il-kontenut lipidu, il-permeazzjoni/id-diffużjoni tal-membrana (5) (6), il-volum ta' ventilazzjoni tal-ħut (7) u b'approċċ tal-bilanċ tal-fugaċità/massa (8) (9) (10). Fi Crookes & Brooke tingħata valutazzjoni dettaljata ta' dawn il-metodi f'dan il-kuntest (11).

([1]) F'ambjenti selvaġġi, ir-rotta li twassal għall-ikbar esponiment f'ambjenti milwiema aktarx li sseħħ permezz ta' inġestjoni għal sustanzi ferm idrofobiċi u b'hekk il-BCF stmat mhuwiex strettament rappreżentattiv tat-tali potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanza.

▼M7

Pubblikazzjoni minn Barber (12) iffokata fuq l-immudellar tal-bijoakkumulazzjoni permezz tat-teħid djetetiku hija siewja wkoll f'dan il-kuntest peress li tinkludi kontribuzzjonijiet mill-mudelli tar-rata ta' teħid mill-garġi. Sezzjoni tad-dokument ta' sfond għall-protokoll djetetiku tal-2004 (13) kienet iddedikata għal dan l-aspett ukoll.

Ħafna minn dawn il-mudelli jidhru li nkisbu bl-użu ta' databases limitati. Għal mudelli li għalihom hemm disponibbli d-dettalji tad-database użata sabiex jinbena l-mudell, jidher li t-tipi ta' sustanzi użati spiss ikunu ta' struttura jew klassi simili (f'termini ta' funzjonalità, eż. organoklori). Dan iżid mal-inċertezza fl-użu ta' mudell li jbassar kostant tar-rata ta' teħid għal tip ta' sustanza differenti, minbarra kunsiderazzjonijiet speċifiċi għat-test bħal speċi, temperatura, eċċ.

Reviżjoni tat-tekniki disponibbli (11) weriet li ebda metodu wieħed ma huwa "iktar korrett" mill-oħrajn. Għalhekk, għandha tingħata ġustifikazzjoni ċara għall-mudell użat. Meta jkun hemm bosta metodi disponibbli li jista' jiġi ġġustifikat l-użu tagħhom, jista' jkun prudenti li jiġu ppreżentati bosta stimi tal-k_1 (u b'hekk il-BCF) jew medda ta' valuri tal-k_1 (u l-BCF) skont bosta metodi għall-istima tat-teħid. Madankollu, minħabba d-differenzi fit-tipi ta' mudelli u s-settijiet ta' dejta użati sabiex jiġu żviluppati, it-teħid ta' valur mill-istimi derivati b'mod differenti ma jkunx xieraq.

Ċerti riċerkaturi stipulaw li l-istimi tal-BCF ta' din ix-xorta jeħtieġu korrezzjoni tal-bijodisponibilità sabiex jitqies l-adsorbiment ta' sustanza għal karbonju organiku dissolt (DOC) f'kundizzjonijiet tal-esponiment milwiem, sabiex l-istimi tinġieb konformi mar-riżultati minn studji tal-esponiment milwiem (eż. (13) (14)). Madankollu, din il-korrezzjoni ma tistax tkun xieraq minħabba l-livelli baxxi ta' DOC meħtieġa fi studju tal-esponiment milwiem għal stima tal-"agħar każ" (jiġifieri proporzjon tas-sustanza bijodisponibbli għal sustanza kif imkejla fis-soluzzjoni). Għal sustanzi ferm idrofobiċi, it-teħid fil-garġi jista' jsir limitat minħabba r-rata ta' diffużjoni passiva qrib il-wiċċ tal-garġi; f'dan il-każ, huwa possibbli li l-korrezzjoni tista' tkun tqis dan l-effett minflok għal dak li kienet imfassla għalih.

Huwa rakkomandat li jiġi ffokat fuq il-metodi li jeħtieġu inputs li għalihom sejjer ikun hemm dejta disponibbli għal sustanzi ttestjati skont l-istudju djetetiku deskritt hawn (jiġifieri log K_{OW}, piż tal-ħut). Jistgħu jiġu applikati metodi oħrajn li jeħtieġu inputs iktar kumplessi, iżda dawn jistgħu jkunu jeħtieġu kejliet addizzjonali fit-test jew għarfien dettaljat dwar is-sustanza tat-test jew l-ispeċi tal-ħut li jaf ma jkunux għad-dispożizzjoni faċilment. Barra minn hekk, l-għażla tal-mudell tista' tkun influwenzata mil-livell ta' validazzjoni u d-dominju ta' applikabilità (ara (11) għal reviżjoni u paragun ta' metodi differenti).

Ta' min jiftakar li l-istima tal-k_1 li tirriżulta, u l-BCF stmat, huma inċerti u jista' jkollhom bżonn jiġu ttrattati f'approċċ tal-piż tal-evidenza flimkien mal-BMF u l-parametri tas-sustanza (eż. id-daqs tal-molekoli) għal stampa sħiħa tal-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni ta' sustanza. L-interpretazzjoni u l-użu ta' dawn il-parametri jistgħu jiddependu mill-qafas regolatorju.

TAGĦRIF

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. PROVATA' L-IŻVILUPP FIŻ-ŻGHOŻIJA TAL-ĦUT

1. METODU

Dan il-metodu tal-prova tat-tossiċità fl-iżvilupp huwa replika ta' l-OECD TG 215 (2000).

1.1. DAĦLA

Din il-prova hija ddisinjata biex isir stima ta' l-effetti ta' espożizzjoni fit-tul għall-kimiċi fuq l-iżvilupp ta' ħut żagħżugħ. Hija bbażata fuq metodu, żviluppat u ppruvat permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (1)(2) fl-Unjoni Ewropea, biex issir stima ta' l-effetti tal-kimiċi fuq l-iżvilupp tal-ħut żagħżugħ ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (*Oncorynchus mykiss* – rainbow trout) taħt kondizzjonijiet flow-through. Speċi oħra li huma ddokumentati tajjeb jistgħu jintużaw. Per eżempju, inkisbet esperjenza minn provi ta' l-iżvilupp biż-zebrafish (*Danio rerio*) ([1]) (3)(4) u bir-ricefish (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Ara wkoll id-Daħla Ġenerali l-Parti Ċ.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tagħti effett osservat (LOEC): hija l-iktar konċentrazzjoni baxxa ta' sustanza tal-prova li ġiet ippruvata li fiha s-sustanza hija osservata li għandha effett sinifikattiv (fi $p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha li huma aktar għoljin mil-LOEC għandu jkollhom effett perikoluż daqs jew aktar minn dawk osservati fil-LOEC.

Konċentrazzjoni li ma tagħti l-ebda effett osservat (NOEC): hija l-konċentrazzjoni tal-prova immedjatament taħt il-LOEC.

$\mathbf{EC_x}$: f'dan il-metodu tal-prova hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova li tikkaġuna varjazzjoni fir-rata ta' żvilupp tal-ħut ta' x % meta mqabbla mal-kontrolli.

Rata tat-tagħbija: hija l-piż imxarrab ta' ħut f'volum ta' ilma.

Densità tal-ħżin: hija n-numru ta' ħut f'volum ta' ilma.

Rata ta' żvilupp speċifika għall-ħuta individwali: tesprimi r-rata ta' żvilupp ta' ħuta individwali bbażata fuq il-piż inizjali tagħha.

Rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank: tesprimi r-rata ta' żvilupp medja ta' popolazzjoni ġo tank għal konċentrazzjoni waħda.

Rata ta' żvilupp psewdo speċifika: tesprimi r-rata ta' żvilupp individwali mqabbla mal-piż inizjali medju tal-popolazzjoni tat-tank.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. PRINĊIPJUTAL-METODU TAL-PROVA

Ħut żagħżugħ f'fażi ta' żvilupp esponenzali huwa mqiegħed, wara li jintiżen, f'kompartimenti tal-prova u huwa espost għal firxa ta' konċentrazzjonijiet sotto-letali tas-sustanza tal-prova maħlula fl-ilma preferibbilment taħt kondizzjonijiet flow-through, jew, jekk dan mhux possibbli, taħt kondizzjonijiet semistatiċi (ta' tiġdid statiku) xierqa. It-tul ta' żmien tal-prova huwa ta' 28 jum. Il-ħut huwa mitmugħ kuljum. Ir-razzjon ta' l-ikel huwa bbażat fuq il-piżijiet inizjali tal-ħut u jista' jerġa' jiġi kkalkolat wara 14-il jum. Fit-tmiem tal-prova, il-ħut jerġa' jintiżen. L-effetti fuq ir-rati ta' żvilupp huma analizzati bl-użu ta' mudell tar-rigressjoni sabiex issir stima tal-konċentrazzjoni li tikkaġuna varjazzjoni fir-rata ta' żvilupp ta' x %, i.e. EC_x (eż. EC_{10}, EC_{20}, jew EC_{30}). Alternattivament, id-data tista' titqabbel mal-valuri tal-kontroll sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tagħti effett osservat (LOEC) u għalhekk il-konċentrazzjoni li ma tagħti l-ebda effett osservat (NOEC).

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAL-PROVA

Ir-riżultati tal-prova ta' tossiċċità akuta (ara l-metodu tal-prova Ċ1). Dan jimplika li s-solubilità fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza tal-prova huma magħrufa u li metodu analitiku u ta' min joqgħod fuqu għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis- soluzzjonijiet tal-prova bi preċiżjoni u b'limitu ta' osservazzjoni magħrufa u rraportati huwa disponibbli.

Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali, purità tas-sustanza, stabbiltà fl-ilma u fid-dawl, pK_a, P_{ow} u riżultati tal-prova għal bijodigradibilità fil-pront (ara l-metodu tal-prova Ċ.4).

1.5. VALIDITÀTAL–PROVA

Sabiex il-prova tkun valida għandhom japplikaw il-kondizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità fil-kontroll(i) ma jistax jeċċedi l-10 % fit-tmiem tal-prova,

— il-piż medju tal-ħut fil-kontroll(i) għandu jkun żdied biżżejjed biex jippermetti l-osservazzjoni tal-varjazzjoni minima tar-rata ta' żvilupp li hi meqjusa bħala sinifikattiva. Prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (2) uriet li għal ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout) il-piż medju ta' ħut fil-kontrolli żdied mill-inqas bin-nofs (i.e. 50 %) tal-piż inizjali medju tagħhom fmedda ta' 28 jum, eż. piż inizjali: 1 g/ħut (= 100 %), piż finali wara 28 jum: > 1,5 g/ħut (≥ 150 %),

— il-konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul kienet mill-inqas 60 % tal-valur ta' saturazzjoni ta' l-arja (ASV) matul il-prova,

— it-temperatura ta' l-ilma m'għandhiex tvarja b'aktar minn ± 1 °C bejn il-kompartimenti tal-prova fxi ħin partikolari matul il-prova u għandha tinżamm f firxa ta' 2 °C fil-firxiet ta' temperatura speċifikati għall-ispeċi tal-prova (l-Appendiċi 1).

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL–PROVA

1.6.1. **Apparat**

Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

— metri ta' l-ossiġnu u tal-pH;

▼B

— tagħmir għad-determinazzjoni ta' l-ebusija u l-alkalinità ta' l-ilma;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment moniturjar kontinwu;

— tankijiet magħmula minn materjal li huwa inert għall-kimika u ta' kapaċità adattata skond it-tagħbija u d-densità tal-ħżin rakkomandati (ara it-taqsima 1.8.5 u l-Appendiċi 1);

— bilanċ preċiż kif xieraq (i.e. preċiż sa ± 0,5 %).

1.6.2. **Ilma**

Kull ilma li fih l-ispeċi tal-prova turi sopravivenza fit-tul u żvilupp adattat jista' jintuża bħala ilma tal-prova. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tal-prova. Il-pH ta' l-ilma għandu jkun fil-firxa ta' 6,5 sa 8,5, imma matul prova partikolari għandu jkun f'firxa ta' ± 0,5 unitajiet tal-pH. Ebusija ogħla minn 140 mg/l (bħala $CaCO_3$) hija rakkomandata. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma għat-taħlit ma jaffettwax ir-riżultati tal-prova b'mod eċessiv (per eżempju billi jbiddel il-karattru ġenerali tas-sustanza tal-prova), għandhom jittieħdu kampjuni f'intervalli għall-analiżi. Tiqjis ta' metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd u Ni), anjoni u katjoni maġġuri (eż. Ca, Mg, Na, K, Cl u SO_4), pestiċidi (eż. pestiċidi ta' l-organofosforu totali u ta' l-organoklorin totali), karbonju organiku totali u solidi f'forma ta' suspensjoni għandu jsir, per eżempju, kull tliet xhur fejn l-ilma għat-taħlit huwa magħruf li hu ta' kwalità relattivament kostanti. Jekk il-kwalità ta' l-ilma intweriet li kienet konstanti matul ta' l-inqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jsiru inqas spiss u l-intervalli jiġu estiżi (eż. kull sitt xhur). Xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma għat-taħlit li huwa aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2.

1.6.3. **Soluzzjonijiet tal-prova**

Soluzzjonijiet tal-prova tal-konċentrazzjonijiet magħżula huma preparati billi soluzzjoni tal-ħżin tiġi mħallta ma' l-ilma.

Is-soluzzjoni tal-ħżin għandha preferibbilment tkun preparata sempliċiment billi s-sustanza tal-prova tiġi mħallta jew aġitata fl-ilma għat-taħlit bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. tħawwid jew ultrasonikazzjoni). Kolonni ta' saturazzjoni (kolonni ta' solubilità) jistgħu jintużaw biex tinkiseb soluzzjoni konċentrata tal-ħżin adattata.

L-użu ta' solventi jew ta' aġenti li jiffaċilitaw is-solubbilità (dispersants) jista' jkun meħtieġ f'xi każijiet biex tkun magħmula soluzzjoni tal-ħżin ta' konċentrazzjoni adattata. Eżempji ta' solventi adattati huma aċeton, etanol, metanol, dimethylsulfoxide, dimethylformamide u triethyleneglycol. Eżempji ta' aġenti li jiffaċilitaw is-solubbilità (dispersants) adattati huma Cremophor RH40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % u HCO-40. Attenzjoni għandha tittieħed meta jkunu qed jintużaw aġenti li huma faċilment bijodigradabbli (eż. aċeton) u/jew komposti li huma volatili ħafna għax dawn jistgħu jikkaġunaw problemi bit-tkattir ta' batterja fil-provi flow-through. Meta jintuża aġent li jiffaċiltà s-solubbilità dan m'għandux jkollu effetti sinifikattivi fuq l-iżvilupp tal-ħut u l-inqas effetti negattivi viżibbli fuq il-ħut żagħżugħ kif svelat b'kontroll li juża s-solvent biss.

▼B

Għal provi flow-through, hija meħtieġa sistema li kontinwament tqassam u tħallat bl-ilma s-soluzzjoni tal-ħżin tas-sustanza tal-prova (eż. pompa li tkejjel u tqassam bil-miter, tagħmir li jħallat is-sustanza ma' l-ilma b'mod proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) biex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet lill-kompartimenti tal-prova. Ir-rati ta' ċaqliq tas-soluzzjonijiet tal-ħżin u ta' l-ilma għat-taħlit għandhom jiġu kkontrollati f'intervalli, preferibbilment ta' kuljum, matul il-prova u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul il-prova. Prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (2) uriet li, għal ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), frekwenza tat-tneħħija ta' l-ilma matul il-prova ta' 6 litri/g ta' ħut/jum hija aċċettabbli (ara it-taqsima 1.8.2.2).

Għal provi semi-statiċi (ta' tiġdid), il-frekwenza ta' tiġdid tal-likwidu tiddependi fuq l-istabbiltà tas-sustanza tal-prova, imma tiġdid ta' kuljum ta' l-ilma huwa rakkomandat. Jekk, minn provi ta' stabbiltà preliminarji (ara t-taqsima 1.4), il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova ma tkunx stabbli (i.e. barra mill-firxa ta' 80-120 % tal konċentrazzjoni nominali jew taqa' inqas minn 80 % tal-konċentrazzjoni inizjali meqjusa) matul il-perjodu ta' tiġdid, għandha tingħata konsiderazzjoni għall-użu ta' prova flow-through.

1.6.4. **Għażla ta' l-ispeċi**

L-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (*Oncorhynchus mykiss* – rainbow trout) huwa l-ispeċi rakkomandat għal din il-prova peress li ħafna mill-esperjenza kienet akkwistata minn prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) b'dan l-ispeċi (1) (2). Madankollu, speċi oħra li huma ddokumentati tajjeb jistgħu jintużaw imma l-proċedura tal-prova għandha mnejn ikollha tiġi adattata biex tipprovdi kondizzjonijiet tal-prova adattati. Per eżempju, esperjenza hija wkoll disponibbli biż-zebrafish (*Danio rerio*) (3) (4) u r-ricefish (medaka, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7). Ir-raġuni fundamentali għall-għażla ta' l-ispeċi u tal-metodu esperimentali għandhom jiġu rrapportati f'dan il-każ.

1.6.5. **Żamma tal-ħut**

Il-ħut tal-prova għandu jiġi magħżul minn popolazzjoni ta' stokk wieħed, preferibbilment mill-istess wild, li tkun ilha miżmuma għal mill-inqas ġimagħtejn qabel il-prova taħt kondizzjonijiet ta' kwalità ta' l-ilma u ta' illuminazzjoni simili għal dawk użati fil-prova. Għandhom jingħataw razzjon minimu ta' ikel ta' 2 % tal-piż tal-ġisem kuljum u preferibbilment ta' 4 % tal-piż tal-ġisem kuljum matul il-perjodu taż-żamma u matul il-prova.

Wara perjodu ta' stabbilizzazzjoni ta' 48 siegħa, l-imwiet jiġu reġistrati u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

— imwiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-grupp intier jiġi mwarrab,

— imwiet ta' bejn il-5 % u l-10 % tal-popolazzjoni: akklimatizzazzjoni għal sebat ijiem addizjonali, jekk aktar minn 5 % mortalità matul it-tieni sebat ijiem, il-grupp intier jiġi mwarrab,

— imwiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: aċċetta l-grupp.

Il-ħut m'għandux jirċievi trattament għall-mard fil-ġimagħtejn ta' qabel il-prova, jew matul il-prova.

▼B

1.7. DISINN TAL-PROVA

L-“ippjanar tal-prova” huwa relatat ma' l-għażla tan-numru u ta' l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tal-prova, in-numru ta' rankijiet għal kull livell ta' konċentrazzjoni u n-numru ta' ħut f'kull tank. Idealment, id-disinn tal-prova għandu jkun magħżul skond:

— l-għan ta' l-istudju;

— il-metodu ta' analiżi ta' l-istatistika li ser jintuża;

— id-disponibbiltà u l-ispiża tar-riżorsi esperimentali.

Il-prospett ta' l-għan għandu, jekk hu possibbli, jispeċifika l-qawwa ta' l-istatistika li fiha ammont partikolari ta' differenza fid-daqs (eż. fir-rata ta' żvilupp) huwa meħtieġ biex jiġi osservat jew, alternattivament, il-preċiżjoni li biha l-EC_x (eż. fejn x = 10, 20, jew 30, u preferibbilment mhux inqas minn 10) hija meħtieġa biex tkun stmata. Mingħajr dan, ma tistax tingħata preskrizzjoni ferma tad-daqs ta' l-istudju.

Huwa importanti li jingħaraf li d-disinn li huwa l-aħjar (jagħmel l-aħjar użu mir-riżorsi) għall-użu ma' metodu wieħed ta' analiżi ta' l-istatistika mhuwiex neċessarjament l-ottimu għall-użu ma' ieħor. Id-disinn rakkomandat għall-istima ta' LOEC/NOEC għalhekk ma jkunx l-istess bħal dak rakkomandat għal analiżi bir-rigressjoni.

F'għadd kbir ta' każijiet, analiżi bir-rigressjoni hija preferibbli minn analiżi tal-varjanza, għal raġunijiet iddiskutati minn Stephan u Rogers (8). Madankollu, meta ma jinstab l-ebda mudell tar-rigressjoni adattat ($r_2 < 0,9$) in-NOEC/LOEC għandhom jintużaw.

1.7.1. **Disinn għal analiżi bir-rigressjoni**

Il-konsiderazzjonijiet importanti fid-disinn tal-prova li ser tiġi analizzata bir-rigressjoni huma:

— Huwa meħtieġ li l-konċentrazzjoni li tagħti effett (eż. $EC_{10, 20, 30}$) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet li fiha l-effett tas-sustanza tal-prova huwa ta' interess, ikunu koperti mill-konċentrazzjonijiet inklużi fil-prova. Il-preċiżjoni li biha jistgħu jsiru l-istimi tal-konċentrazzjonijiet li jagħtu effett, tkun l-aqwa meta l-konċentrazzjoni li tagħti effett tkun fin-nofs tal-firxa ta' konċentrazzjonijiet ppruvati. Prova preliminarja biex tinstab il-firxa tista' tkun ta' għajnuna biex jintgħażlu l-konċentrazzjonijiet tal-prova xierqa.

— Biex ikun possibbli li jsir mudellar sodisfaċenti ta' l-istatistika, il-prova għandha tinkludi mill-inqas tank tal-kontroll wieħed u ħames tankijiet addizjonali b'konċentrazzjonijiet differenti. Fejn xieraq, meta jintuża aġent li jiffaċilità s-solubbilità, barra mis-serje tal-prova għandu jsir kontroll wieħed li jkun jinstab fih dan l-aġent fl-iktar konċentrazzjoni għolja li ġiet ppruvata (ara t-taqsimiet 1.8.3 u 1.8.4).

— Serje ġeometrika jew logaritmika xierqa (9) (ara l-Appendiċi 3) tista' tintuża. L-ispazjar logaritmiku tal-konċentrazzjoni tal-prova għandha tkun preferuta.

▼B

— Jekk aktar minn sitt tankijiet huma disponibbli, it-tankijiet addizjonali għandhom jew jintużaw biex jipprovdu replikazzjoni jew ikunu distribwiti mal-firxa tal-konċentrazzjonijiet sabiex jiffaċilitaw spazjar eqreb tal-livelli. Kemm il-waħda kif ukoll l-oħra minn dawn il-miżuri huma ugwalment mixtieqa.

1.7.2. **Disinn għall-istima ta' NOEC/LOEC bl-użu ta' l-analiżi tal-varjanza (ANOVA)**

Preferibbilment għandu jkun hemm tankijiet replikati f'kull konċentrazzjoni, u l-analiżi ta' l-istatistika għandha tkun fil-livell tat-tank (10). Minħajr tankijiet replikati, ma tista' ssir l-ebda konċessjoni għall-varjabilità bejn it-tankijiet aktar minn dik dovuta għall-ħut individwali. Madankollu, l-esperjenza uriet (11) li l-varjabilità bejn it-tankijiet kienet żgħira ħafna meta mqabbla mal-varjabilità ġottank (i.e. bejn il-ħut) fil-każ eżaminat. Għalhekk alternattiva li hi relattivament aċċettabbli hi li ssir analiżi ta' l-istatistika fil-livell tal-ħut individwali.

Konvenzjonalment, jintużaw mill-inqas ħames konċentrazzjonijiet tal-prova f'serje ġeometrika b'fattur li preferibbilment ma jeċċedix it-3,2.

Ġeneralment, meta jsiru provi b'tankijiet replikati, in-numru ta' tankijiet tal-kontroll replikati u għalhekk in-numru ta' ħut għandu jkun id-doppju tan-numru f'kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova, li għandhom ikunu ta' daqs ugwali (12) (13) (14). Min naħa l-oħra, fin-nuqqas ta' tankijiet replikati, in-numru ta' ħut fil-grupp tal-kontroll għandu jkun l-istess bħan-numru f'kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova.

Jekk l-ANOVA għandha tkun bbażata fuq it-tankijiet minflok fuq il-ħut individwali (li jkun jinvolvi jew l-immarkar individwali tal-ħut jew l-użu ta' rati ta' żvilupp "psewdo" speċifiċi (ara t-taqsima 2.1.2)), hemm il-ħtieġa li jkun hemm biżżejjed replikazzjoni ta' tankijiet biex id-devjazzjoni standard ta' "tankijiet fil-konċentrazzjonijiet" tkun tista' tiġi determinata. Dan ifisser li l-gradi ta' ħelsien għall-iżbalji fl-analiżi tal-varjanza għandhom ikunu mill-inqas 5 (10). Jekk il-kontrolli biss huma replikati, hemm il-periklu li l-varjabilità fl-iżbalji tkun preġudikata għax għandha mnejn tiżdied skond il-valur medju tar-rata ta' żvilupp li ssemmiet. Peress li r-rata ta' żvilupp x'aktarx tonqos meta l-konċentrazzjoni tiżdied, dan ikollu tendenza li jwassal għal stima ogħla tal-varjabilità.

1.8. PROĊEDURA

1.8.1. **Għażla u użin tal-ħut tal-prova**

Huwa importanti li l-varjazzjoni fil-piż tal-ħut fil-bidu tal-prova tiġi mnaqqsa kemm jista' jkun. Firxiet ta' daqs adattati għall-ispeċi differenti li huma rakkomandati għall-użu f'din il-prova jingħataw fl-Appendiċi 1. Għall-grupp kollu ta' ħut użat fil-prova, il-firxa ta' piżijiet individwali fil-bidu tal-prova għandha idealment tinżamm fil-± 10 % tal-piż medju aritmetiku u, f'kull każ, m'għandux jeċċedi l-25 %. Huwa rak komandat li sottokampjun ta' ħut jiġi peżat qabel il-prova sabiex issir stima tal-piż medju.

▼B

L-ikel għandu jinżamm mill-popolazzjoni tal-ħżin għal 24 siegħa qabel ma tibda l-prova. Il-ħut għandu imbagħad jintgħażel saltwarjament. Bl-użu ta' anestetiku ġenerali (eż. soluzzjoni fl-ilma ta' 100 mg/l tricaine methane sulphonate (MS 222) newtralizzata bi żżieda ta' żewġ partijiet bikarbonat tas-sodju għal kull parti ta' MS 222), il-ħut għandu jintiżen individwalment bħala piż imxarrab (ixxugat) bil-preċiżjoni mniżżla fl-Appendiċi 1. Dawk il-ħut li l-piż tagħhom ikun fil-firxa maħsuba għandhom jinżammu u għandhom imbagħad jiġu mqassma b'mod saltwarju bejn il-reċipjenti tal-prova. Il-piż imxarrab totali tal-ħut f'kull reċipjent tal-prova għandu jiġi reġistrat. L-użu ta' anestetiċi u bl-istess mod l-immaniġġjar tal-ħut (inkluż l-ixxugar u l-użin) jista' jikkaġuna tensjoni u ħsara lill-ħut żagħżugħ, b'mod partikolari lil dawk l-ispeċi ta' daqs żgħir. Għalhekk l-immaniġġjar ta' ħut żagħżugħ għandu jsir bl-akbar attenzjoni biex jiġi evitat li l-annimali tal-prova tinħolqilhom tensjoni u ħsara.

Il-ħut jerġgħu jintiżnu fil-jum 28 tal-prova (ara t-taqsima 1.8.6). Madankollu, jekk ikun meqjus li hu meħtieġ li jerġa' jiġi kkalkolat ir-razzjon ta' l-ikel, il-ħut jista' jerġa' jintiżen fil-jum 14 tal-prova (ara t-taqsima 1.8.2.3). Metodu ieħor bħall-metodu fotografiku jista' jintuża biex jiġi stabbilit it-tibdil fid-daqs tal-ħut li fuq il-bażi tiegħu r-razzjonijiet ta' l-ikel jistgħu jiġu aġġustati.

1.8.2. **Kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.8.2.1. *Tul ta' żmien*

It-tul ta' żmien tal-prova hi ≥ 28 jum.

1.8.2.2. *Rati tat-tagħbija u densitjiet tal-ħżin*

Huwa importanti li r-rata tat-tagħbija u d-densità tal-ħżin huma xierqa għall-ispeċi tal-prova użati (ara l-Appendiċi 1). Jekk id-densità tal-ħżin tkun għolja wisq, allura jkun hemm tensjoni minħabba fl-iffullar esaġerat li jirriżulta f'rati ta' żvilupp imnaqqsa u possibbilment fil-mard. Jekk tkun baxxa wisq, tista' tikkaġuna mġieba territorjali li tista' wkoll taffettwa l-iżvilupp. F'kull każ, ir-rata tat-tagħbija għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul ta' mill-inqas 60 % ASV tista' tinżamm mingħajr arjazzjoni. Programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (3) wera li, għall-ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), rata tat-tagħbija ta' 16 il-ħuta ta' dan l-ispeċi ta' 3-5 g f'volum ta' 40-litru hija aċċettabbli. Il-frekwenza rakkomandata għat-tneħħija ta l-ilma matul il-prova hija ta' 6 litri/g ta' ħut/jum.

1.8.2.3. *Tmigħ*

Il-ħut għandhom jiġu mitmugħa b'ikel xieraq (l-Appendiċi 1) b'rata suffiċjenti li tikkaġuna rata ta' żvilupp aċċettabbli. Għandha tittieħed attenzjoni biex jiġi evitat l-iżvilupp ta' mikrobi u d-dardir ta' l-ilma. Għall-ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), rata ta' 4 % tal-piż tagħom tal-ġisem kuljum għandha x'aktarx tissodisfa dawn il-kondizzjonijiet (2)(15)(16)(17). Ir-razzjon ta' kuljum jista' jitqassam f'żewġ porzjonijiet indaqs u jingħata lill-ħut f'żewġ ikliet kuljum, imbegħdin b'ta' l-inqas ħames sigħat. Ir-razzjon huwa bbażat fuq il-piż totali inizjali tal-ħut f'kull reċipjent tal-prova. Jekk il-ħut jerġgħu jintiżen fil-jum 14, ir-razzjon jerġa' jiġi kkalkolat. L-ikel għandu jinżamm mill-ħut 24 siegħa qabel l-użin.

▼B

L-ikel li ma jittiekilx u l-materjal tal-ħmieġ ta' l-imsaren għandu jitneħħa kuljum mir-reċipjenti tal-prova permezz ta' tindif bl-attenzjoni tal-qiegħ ta' kull tank bl-irdigħ.

1.8.2.4. *Dawl u temperatura*

Il-fotoperjodu u t-temperatura ta' l-ilma għandhom ikunu xierqa għall-ispeċi tal-prova (l-Appendiċi 1).

1.8.3. **Konċentrazzjonijiet tal-prova**

Normalment ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma meħtieġa, ikun xi jkun d-disinn tal-prova (ara t-taqsima 1.7.2). Tagħrif minn qabel tat- tossiċità tas-sustanza tal-prova (eż. minn prova akuta u/jew minn studji biex tinstab il-firxa) għandhom ikunu ta' għajnuna biex jintgħażlu l-konċentrazzjonijiet tal-prova xierqa. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk inqas minn ħames konċentrazzjonijiet huma użati. L-ogħla konċentrazzjoni ppruvata m'għandhiex teċċedi l-limitu tas-solubilità tas-sustanza fl-ilma.

Fejn jintuża aġent li jiffaċilità s-solubbilità biex igħin fil-preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-ħżin, il-konċentrazzjoni finali tiegħu m'għanduz ikun aktar minn 0,1 ml/l u għandu preferibbilment ikun l-istess fir-reċipjenti kollha tal-prova (ara t-taqsima 1.6.3). Madankollu, għandu jsir kull sforz biex jiġi evitat l-użu ta' materjali bħal dawn.

1.8.4. **Kontrolli**

In-numru ta' kontrolli bl-ilma tat-taħlit jiddependi fuq id-disinn tal-prova (ara t-taqsimiet 1.7-1.7.2). Jekk jintuża aġent li jiffaċilità s-solubbilità, allura l-istess numru ta' kontrolli bl-aġenti li jiffaċilitaw s-solubbilità daqs kontrolli bl-ilma tat-taħlit għandhom jiġu inklużi wkoll.

1.8.5. **Frekwenza ta' determinazzjonijiet analitiċi u tiqjis**

Matul il-prova, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma determinati f'intervalli regolari (ara hawn taħt).

Fil-provi flow-through, ir-rati ta' ċaqliq tas-soluzzjoni ta' ħżin dilwenti u tossikanti għandhom jiġu kkontrollati f'intervalli, preferibbilment kuljum, u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul il-prova. Fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma mistennija li jkunu bejn il-± 20 % tal-valuri nominali (i.e. fil-firxa ta' 80-120 %; ara t-taqsimiet 1.6.2 u 1.6.3), huwa rakkomandat li, bħala minimu, il-konċentrazzjonijiet l-aktar għoljin u dawk l-aktar baxxi jiġu analizzati fil-bidu tal-prova u f'intervalli ta' kull ġimgħa wara dan. Għall-prova fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova mhix mistennija li tibqa' bejn il-± 20 % tal-valuri nominali (fuq il-bażi ta' data dwar l-istabbiltà tas-sustanza tal-prova), huwa meħtieġ li jiġu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha, imma bl-użu ta' l-istess reġim.

Fil-provi semi-statiċi (ta' tiġdid) fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova hija mistennija li tibqa' bejn il-± 20 % tal-valuri nominali, huwa rakkomandat li, bħala minimu, il-konċentrazzjonijiet tal-prova l-aktar għoljin u dawk l-aktar baxxi jiġu analizzati meta ppreparati friski u immedjatament qabel it-tiġdid fil-bidu ta' l-istudju u ta' kull ġimgħa wara dan. Għall-provi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova mhix mistennija li tibqa' bejn il-± 20 % tal-valuri nominali, il-konċentrazzjonijiet kollha tal-prova iridu jiġu analizzati bl-użu ta' l-istess reġim bħal dak użat għal sustanzi aktar stabbli.

▼B

Huwa rakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet meqjusa. Madankollu, jekk ikun hemm evidenza disponibbli biex turi li l-konċentrazzjoni ta' soluzzjoni tas-sustanza tal-prova inżammet b'mod sodisfaċenti bejn il-± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-konċentrazzjoni inizjali meqjusa matul il-prova, allura r-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri nominali jew meqjusa.

Il-kampjuni jistgħu jeħtieġu li jiġu ffiltrati (eż. bl-użu ta' daqs tal-pori ta' 0,45 μm) jew soġġetti għal azzjoni ċentrifuga. Iċ-ċentrifugazzjoni hija l-proċedura rakkomandata. Madankollu, jekk il-materjal tal-prova ma jiġix assorbit mill-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll.

Matul il-prova, għandhom jitqiesu l-ossiġnu maħlul, il-pH u t-temperatura fir-reċipjenti tal-prova kollha. L-ebusija totali, l-alkalinità u s-salinità (jekk relevanti) għandhom jitqiesu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed ta' l-ogħla konċentrazzjoni. Bħala minimu, l-ossiġnu maħlul u s-salinità (jekk relevanti) għandhom jitqiesu tliet darbiet (fil-bidu, fin-nofs u fit-tmiem tal-prova). Fi provi semi-statiċi, huwa rakkomandat li l-ossiġnu maħlul jitqies aktar spiss, preferibbilment qabel u wara kull tiġdid ta' l-ilma jew mill-inqas darba fil-ġimgħa. Il-pH għandha titqies fil-bidu u fit-tmiem ta' kull tiġdid ta' l-ilma fi prova tat-tiġdid statiku u ta' l-inqas darba fil-ġimgħa fi provi flow-through. L-ebusija u l-alkalinità għandhom jitqiesu darba f'kull prova. It-temperatura preferibbilment għandha tkun ikkontrollata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wieħed tal-prova.

1.8.6. **Osservazzjonijiet**

Piż: Fit-tmiem tal-prova l-ħut kolha li jibqgħu ħajjin għandhom jintiżnu bħala piż imxarrab (ixxugat) jew fi gruppi skond ir-reċipjent tal-prova jew individwalment. L-użin ta' l-annimali bir-reċipjent tal-prova huwa preferibbli mill-użin individwali li jeħtieġ li l-ħut ikun immarkat individwalment. Fil-każ ta' tiqjis tal-piżijiet individwali għad-determinazzjoni tar-rata ta' żvilupp speċifika għall-ħuta individwali, il-metodu ta' teknika ta' l-immarkjar magħżula għandha tevita li toħloq tensjoni fl-annimali (alternattivi għall-immarkjar bl-iffriżar jistgħu jkunu xierqa, eż. l-użu ta' xlief fin ikkulurit).

Il-ħut għandu jkun eżaminat kuljum matul il-perjodu tal-prova u kull anormalità esterna (bħal emorraġija, telf tal-kulur) u mġieba anormali nnotata. Kull mewt għandu jiġi rreġistrat u l-ħut mejjet jitneħħa malajr kemm jista' jkun. Il-ħut mejjet ma jiġix sostitwit, ir-rata tat-tagħbija u d-densità tal-ħżin huma biżżejjed biex jiġu evitati effetti fuq l-iżvilupp minħabba bdil fin-numru ta' ħut f'kull tank. Madankollu, ir-rata ta' tmigħ tkun teħtieġ li tiġi aġġustata.

2. ***DATA* U RAPURTAĠĠ**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Huwa rakkomandat li espert ta' l-istatistika jkun involut kemm fid-disinn kif ukoll fl-analiżi tal-prova peress li dan il-metodu tal-prova jippermetti varjazzjoni konsiderevoli fid-disinn esperimentali bħal per eżempju, fin-numru ta' kompartamenti tal-prova, numru ta' konċentrazzjonijiet tal-prova, numru ta' ħut, eċċ. Minħabba l-għażliet li huma disponibbli fid-disinn tal-prova, gwida speċifika dwar il-proċedura ta' l-istatistika ma tingħatax hawn.

▼B

Ir-rati ta' żvilupp m'għandhomx jiġu kkalkolati għar-reċipjenti tal-prova fejn il-mortalità teċċedi l-10 %. Madankollu, ir-rata tal-mortalità għandha tkun indikata għall-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha.

Ikun liema metodu li jintuża biex tiġi analizzata d-data, il-kunċett ċentrali huwa r-rata ta' żvilupp speċifika r bejn il-ħin t_1 u l-ħin t_2. Din tista' tiġi definita f'ħafna modi skond jekk il-ħut hux immarkat individwalment jew le jew skond jekk hix meħtieġa l-medja għat-tank.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

fejn:

r_1 = rata ta' żvilupp speċifika għall-ħuta individwali

r_2 = rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank

r_3 = rata ta' żvilupp "psewdo" speċifika

w_1, w_2 = rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank $\log_e$

w_1 = logaritmu tal-piż ta' ħuta individwali fil-bidu tal-perjodu ta' studju

$\log_e w_2$ = l logaritmu tal-piż ta' ħuta individwali fit-tmiem tal-perjodu ta' studju

$\log_e W_1$ = medja tal-logaritmi tal-valuri w1 għall-ħut fit-tank fil-bidu tal-perjodu ta' studju

$\log_e W_2$ = medja tal-logaritmi tal-valuri w2 għall-ħut fit-tank fil-tmiem tal-perjodu ta' studju

t_1, t_2 = ħin (jiem) fil-bidu u fit-tmiem tal-perjodu ta' studju

r_1, r_2, r_3 jistgħu jiġu kkalkolati għall-perjodu ta' minn 0-28 jum u, fejn xieraq (i.e. meta t-tiqis fil-jum 14 ikun sar) għall-perjodi ta' minn 0-14 u minn 14-28 jum.

2.1.1. **Analiżi tar-riżultati bir-riġressjoni (mudellar tar-rispons għall-konċentrazzjoni)**

Dan il-metodu ta' analiżi jaqbel ma' relazzjoni tal-matematika adattata bejn ir-rata ta' żvilupp speċifika u l-konċentrazzjoni, u għalhekk jagħmel possibbli l-istima ta' l-"EC_x" i.e. kull valur ta' l-EC meħtieġ. Bl-użu ta' dan il-metodu l-kalkolu ta' r għall-ħut individwali (r_1) mhux meħtieġ u minflok, l-analiżi tista' tkun ibbażata fuq il-valur medju għat-tank ta' r (r_2). Dan il-metodu ta' l-aħħar huwa preferut. Huwa wkoll aktar xieraq fil-każ li jintuża l-iżgħar speċi.

Ir-rati ta' żvilupp medji speċifiċi għat-tank (r_2) għandhom jiġu mmarkati fuq graff kontra l-konċentrazzjoni, sabiex tiġi spezzjonata r-relazzjoni tar-rispons mal-konċentrazzjoni.

▼B

Sabiex tiġi mfissra r-relazzjoni bejn r_2 u l-konċentrazzjoni, għandu jintgħażel mudell xieraq u l-għażla tiegħu għandha tkun sostnuta b'raġunar xieraq.

Jekk in-numri ta' ħut li jibqgħu ħajjin f'kull tank ma jkunux l-istess, allura l-proċess ta' tqabbil tal-mudell, kemm jekk sempliċi jew jekk mhux lineari, għandu jiġi peżat biex jippermetti għal gruppi ta' daqsijiet differenti.

Il-metodu ta' tqabbil tal-mudell għandu jagħmel possibbli l-istima ta', per eżempju, l-EC_{20} u tad-dispersjoni tiegħu (jew l-iżball standard jew l-intervall ta' fiduċja). Il-graff tal-mudell imqabbel għandu jintwera fir-rigward tad-data sabiex s-suffiċjenza tat-tqabbil tal-mudell tista' tidher (8)(18)(19)(20).

2.1.2. **Analiżi tar-riżultati għall-istima tal-LOEC**

Jekk il-prova tkun inkludiet ir-replikazzjoni tat-tankijiet fil-livelli kollha tal-konċentrazzjoni, l-istima tal-LOEC tista' tkun ibbażata fuq analiżi tal-varjanza (ANOVA) tar-rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank (ara t-taqsima 2.1), segwita minn metodu adattat (eż. il-prova ta' Dunnett jew ta' Williams (12) (13) (14) (21)) għat-tqabbil tal-medja r għal kull konċentrazzjoni mal-medja r għall-kontrolli biex tiġi identifikata l-aktar konċentrazzjoni baxxa li għaliha din id-differenza hija sinifikattiva f'livell ta' probabbiltà ta' 0,05. Jekk is-supposizzjonijiet meħtieġa għall-metodi parametriċi ma jintlaħqux – distribuzzjoni mhux normali (eż. il-prova ta' Shapiro-Wilk) jew varjanza eteroġena (il-prova ta' Bartlett), għandha tingħata konsiderazzjoni għat-trasformazzjoni tad-data biex jiġu omoġenizzati l-varjanzi qabel ma ssir l-ANOVA, jew biex issir l-ANOVA miżuna.

Jekk il-prova ma tkunx inkludiet ir-replikazzjoni tat-tankijiet f'kull konċentrazzjoni, ANOVA bbażata fuq it-tankijiet ma tkunx sensittiva jew tkun impossibbli. F'din is-sitwazzjoni, kompromess aċċettabbli hu li l-ANOVA tkun ibbażata fuq ir-rata ta' żvilupp "psewdo" speċifika r_3 għall-ħut individwali.

Il-medja ta' l-r_3 għal kull konċentrazzjoni tal-prova tista' imbagħad tiġi mqabbla mal-medja ta' l-r_3 għall-kontrolli. Il-LOEC tista' imbagħad tiġi identifikata bħal qabel. Għandu jiġi konoxxut li dan il-metodu ma jipprovdi l-ebda konċessjoni għal, l-anqas protezzjoni kontra, il-varjabilità bejn it-tankijiet, aktar minn dik li hi ġġustifikata mill-varjabilità ta' bejn il-ħut individwali. Madankollu, l-esperjenza uriet (8) li l-varjabilità bejn it-tankijiet kienet żgħira ħafna meta mqabbla mal-arjabilità ġot-tank (i.e. bejn il-ħut). Jekk il-ħut individwali ma jkunx inkluż fl-analiżi, il-metodu ta' identifikazzjoni ta' *data* anomala (outlier) u l-ġustifikazzjoni għall-użu tagħha għandhom ikunu provduti.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Ir-riżultati għandhom ikunu interpretati bl-attenzjoni fejn il-konċentrazzjonijiet meqjusa ta' tossikant fis-soluzzjonijiet tal-prova jseħħu f'livelli qrib tal-limitu ta' osservazzjoni tal-metodu analitiku jew, fi provi semistatiċi, meta l- konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova tonqos minn soluzzjoni ppreparata friska għal qabel ma tiġġedded.

2.3. RAPPORT TAL-PROVA

Ir-rapport tal-prova għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼B

2.3.1. **Sustanza tal-prova:**

— natura fiżika u proprjetajiet fiżiċikimiċi relevanti,

— *data* dwar l-identifikazzjoni kimika inkluż il-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza tal-prova fejn xieraq.

2.3.2. **Speċi tal-prova:**

— possibbilment, l-isem xjentifiku,

— razza, daqs, fornitur, kull trattament li jkun sar minn qabel, eċċ.

2.3.3. **Kondizzjonijiet tal-prova:**

— proċedura tal-prova użata (eż. semi-statiku/ta' tiġdid, flow-through, tagħbija, densità tal-ħżin, eċċ),

— disinn tal-prova (eż. numru ta' reċipjenti tal-prova, konċentrazzjonijiet u repliki tal-prova, numru ta' ħut f'kull reċipjent),

— metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħżin u frekwenza tat-tiġdid (l-aġent li jiffaċiltà s-solubbilità u l-konċentrazzjoni tiegħu għandhom jingħataw, meta użati),

— il-konċentrazzjonijiet nominali tal-prova, il-medji tal-valuri meqjusa u d-devjazzjonijiet mill-istandard tagħhom fir-reċipjenti tal-prova u l-metodu li bih dawn intlaħqu u evidenza li t-tiqjis jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova f'soluzzjoni vera,

— karatterisitiċi ta' l-ilma għat-taħlit: pH, ebusija, alkalinità, temperatura, konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul, livelli residwali ta' klorin (jekk meqjusa), karbonju organiku totali, solidi f'forma ta' suspensjoni, salinità tal-likwidu tal-prova (jekk meqjus) u kull tiqjis ieħor li jsir,

— kwalità ta' l-ilma fir-reċipjenti tal-prova: pH, ebusija, temperatura u konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul,

— informazzjoni dettaljata dwar it-tmigħ (eż. tip ta' ikel, għajn, ammont mogħti u frekwenza).

2.3.4. **Riżultati:**

— evidenza li l-kontrolli laħqu l-kriterju ta' validità għas-sopravivenza, u data dwar l-imwiet li jseħħu f'kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova,

— metodi ta' teknika ta l-istatistika analitika użati, statistika bbażata fuq ir-repliki jew il-ħut, trattament tad-data u ġustifikazzjoni tal-metodi ta' teknika użati,

— data mqassma f'forma tabulari dwar il-piż ta' ħut individwali u l-piċ medju fil-jiem 0, 14 (jekk meqjusa) u 28, valuri tar-rati ta' żvilupp medji speċifiċi għat-tank jew psewdo speċifiċi (kif xieraq) għall-perjodi 0-28 jum jew possibbilment 0-14 u 14-28,

— riżultati ta' l-analiżi ta' l-istatistika (i.e. analiżi tar-rigressjoni jew ANOVA) preferibbilment f'forma tabulari u grafika u l-LOEC (p = 0,05) u n- NOEC jew l-ECx ma', meta possibbli, l-iżbalji standard, kif xieraq,

▼B

— inċidenza ta' kull reazzjoni mhux tas-soltu mill-ħut u kull effett viżibbli ikkaġunat mis-sustanza tal-prova.

3. REFERENZI

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Ir-Rapport tal-WRc Nru PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M. J and Grandy N. J. (1990). EEC: Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Ir-Rapport Finali Lill-Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej. Ir-Rapport tal-WRc Nru KEE: 2600-M.

(3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pġ. 1855-1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pġ. 157-164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes). Arch. Econ. Conta. Toxicol. 28, pġ. 287-297.

(7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (Oryzias latipes). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner u D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pġ. 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, jew atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Ir-Rapport EPS 1/RM/28, 81 pp. Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(10) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 ta' Diċembru 1991.

(11) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pġ. 1096-1121.

(12) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pġ. 482-491.

(13) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pġ. 103-117.

▼B

(14) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, pġ. 123-133.

(15) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, pġ. 33-41.

(16) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Il-Kapitolu IX fit-Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(17) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pġ. 1485-1494.

(18) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Ir-Rapport EA-6189 (American Petroleum Institute

(19) Publication, Nru 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Ir-Rapport Tekniku Nru 05-88 tan-National Effluent Toxicity Assessment Center. Settembru 1988. 12-il pp.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pġ. 510-531.

▼B

ANNESS 1

SPEĊI TA' ĦUT RAKKOMANDAT GĦALL-PROVA U KONDIZZJONIJIET TAL-PROVA ADATTATI

Speċi	Firxa rakkomandata tat-temperatura tal-prova (°C)	Fotoperjodu (sigħat)	Firxa rakkomandata għall-piż inizjali tal-ħut (g)	Preċiżjoni meħtieġa fit-tiqjis	Rata tat-tagħbija (g/l)	Densità tal-ħżin (kull litru)	Ikel	Tul tal-prova (jiem)
Speċi rakkomandati								
Oncorhynchu s mykiss L-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout)	12,5 - 16,0	12 – 16	1 – 5	Sa l-eqreb 100 mg	1,2 - 2,0	4	Ikel proprjetarju niexef magħmul minn ħut żgħir tas-salmonid	≥ 28
Speċi oħra li huma ddokumentati tajjeb:								
Danio rerio zebrafish	21 – 25	12 – 16	0,050 - 0,100	Sa l-eqreb 1 mg	0,2 - 1,0	5 – 10	Ikel ħaj (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes ricefish (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 - 0,100	Sa l-eqreb 1 mg	0,2 - 1,0	5 – 20	Ikel ħaj (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

ANNESS 2

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA GĦAT-TAĦLIT AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja f'partikoli	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhix jonizzata	< 1 µg/l
Klorin residwali	< 10 µg/l
Pestiċidi ta' l-organofosforu totali	< 50 ng/l
Pestiċidi ta' l-organoklorin totali biż-żjieda ta' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l

▼B

ANNESS 3

Serje logaritmika ta' konċentrazzjonijiet tajbin għat-test ta' tossiċità (9)

Kolonna (numru ta' konċentrazzjonijiet bejn 100 u 10, jew bejn 10 u 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Serje ta' ħames (jew iktar) konċentrazzjonijiet suċċessivi jistgħu jingħażlu minn kolonna. Il-*mid-points* ta' bejn il-konċentrazzjonijiet f'kolonna (x) jinsabu f'kolonna (2x + 1). Il-valuri msemmija jistgħu jirrappreżentaw konċentrazzjonijiet li jingħadu bħala perċentwal f'volum jew piż (mg/l jew µg/l). Il-valuri jistgħu jkunu multiplikati jew diviżi bi kwalunkwe *power of* 10 kif inhu xieraq. Il-kolonna 1 tista' tintuża jekk ikkun hemm inċertezza konsiderevoli fil-livell ta' tossiċità.

▼B

C.15. PROVA TA' TOSSIĊITÀ B'TERMINU QASIR FUQ *EMBRIJONI* U STADJI TA' SAC-FRY TAL-ĦUT

1. METODU

Dan il-metodu ta' ittestjar għal tossiċità b'terminu qasir huwa replika tal-OECD TG 212 (1998).

1.1. DAĦLA

Dan it-test ta' tossiċità b'terminu qasir fuq embrijoni u stadji ta' sac-fry tal-ħut huwa prova b'terminu qasir fejn jiġu esposti l-istadji tal-ħajja minn meta bajda ġdida tiġi fertilizzata sa l-istadju ta' sac-fry. Ebda ikel ma huwa provdut fit-test ta' l-embrijon u sac-fry, u t-test għandu jiġi terminat waqt li s-sac-fry għadhom jiġu nutriti mill-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajda.

L-għan ta' dan it-test huwa sabiex jiddefinixxi effetti letali, u sa ċertu punt effeti sub-letali ta' kimiċi fuq l-istadji speċifiki u fuq l-ispeċi ittestjati. Dan it-test jipprovdi informazzjoni utli b'tali mod li jista' (a) jifforma pont bejn testijiet letali u dawk sub-letali (b) jintuża bħala test ta' screening għal test komplut fuq l-istadji kollha tal-bidu tal-ħajja jew għal test ta' tossiċità kronika u (c) jista' jintuża biex jiġu ittestjati speċi li it-tkabbir tagħhom m'huwiex avvanzat biex ikopri biżżejjed il-perjodu ta' transizzjoni minn nutriment endoġenu għal dak esoġenu.

Ta' min jiftakar li testijiet li jinkorporaw il-fażijiet kollha tal-ħajja tal-ħuta huma ġeneralment suġġetti li jagħtu stima eżatta tat-tossiċità kronika tal-kimiċi għall-ħut, u kwalunkwe tnaqqis fl-espożizzjoni fir-rigward ta' stadji tal-ħajja jistgħu inaqqsu is-sensittività ta' dan it-test u għalhekk jissottovalutaw it-tossiċità kronika. Għalhekk hu mistenni li t-test ta' l-embrijun u ta' l-istadji ta' sac-fry ikun inqas sensittiv minn dak ta' test komplut fuq l-istadji kollha tal-bidu tal-ħajja, partikolarment fejn jidħlu kimiċi li għandhom lipofilità għolja (log P_{ow} > 4) u kimiċi b'mod ta' azzjoni tossika speċifika. Madankollu differenzi żgħar bejn iż-żewġ testijiet huma mistennija għal kimiċi li m'għandhomx mod ta' azzjoni narkotika speċifika (1).

Qabel ma' ġie ppublikat, dan it-test ta' l-embrijun u ta' sac-fry ġie ppruvat l-aktar fuq ħut ta' l-ilma ħelu *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – magħruf aktar bħala zebrafish). Għaldaqstant l-appendiċi 1 jagħti gwida aktar dettaljata ta' l-eżekuzzjoni ta' dan it-test fuq din l-ispeċi. Dan ma jeskludix l-użu ta' speċi oħra għal liema diġà hemm xi prova disponibbli (Tabella 1).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Konċentrazzjoni minima b'effett sinjifikanti (LOEC): hija l-aktar konċentrazzjoni baxxa ttestjata mis-sustanza tat-test fejn is-sustanza ikollha effett sinifikattiv (f'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, kull konċentrazzjoni 'l fuq mill-LOEC għandu jkollha effett ta' ħsara daqs jew aktar minn dawk osservati fl-LOEC.

Konċentrazzjoni massima mingħajr effetti sinifikanti (NOEC): hija l-prova ta' konċentrazzjoni eżatt taħt l-LOEC.

▼B

1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST

L-istadji ta' l-embrijon u tas-sac-fry tal-ħut huma esposti għal sensiela ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza għall-prova dissolta fl-ilma. Il-protokoll jippermetti għażla bejn proċedura semi-statika jew proċedura b'ċirkolazzjoni kontinwa. Din l-għażla tiddependi fuq in-natura tas-sustanza li ser tiġi ittestjata. Dan it-test jibda billi jitpoġġew bajd fertilizzat fil-kontenituri u jintemm eżatt qabel ma l-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd ta' xi waħda mil-larva f'xi kontenitur tkun assorbita kompletament jew qabel ma l-kontrolli jibdew imutu tal-ġuħ. Effetti letali u sub-letali huma evalwati u mqabbla mal-valuri relattivi għall-kontrolli bl-iskop li tiġi determinata l-konċentrazzjoni minima b'effetti sinifikanti. L-alternattiva hi li jiġu analizzati billi jintuza mudell rigressiv sabiex tkun stmata il-konċentrazzjoni li tista' tikkawża effett perċentwali (i.e. LC/ECx, fejn x hija effett % definit).

1.4. INFORMAZZJONI FUQ IS-SUSTANZA TAT-TEST

Ir-riżultati ta' test ta' tossiċità qawwija (ara metodu C.1) preferibilment ma' l-ispeċi magħżula għal dan it-test, għanhom ikunu disponibbli. Ir-riżultati jistgħu jkunu utli biex tintgħażel sensiela ta' konċentrazzjonijiet tat-test mill-istadji tal-bidu tal-ħajja. Is-solubilità ta' l-ilma (inkluż is-solubilità fl-ilma tat-test) u l-pressa tal-fwar għandhom ikunu magħrufa. Għandu jkun hemm metodu ta' min jorbot fuqu disponibbli, għal kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test, b'eżattezza magħrufa u rappurtata kif ukoll il-limitu ta' rivelazzjoni.

L-informazzjoni utli fuq is-sustanza tat-test sabiex jiġu definiti il-kondizzjonijiet għall-eżekuzzjoni tat-test tinkludi il-formola strutturali, il-purità tas-sustanza, dawl stabbli, stabilità fil-kondizzjonijiet ta' l-eżekuzzjoni tat-test, pKa, Pow u r-riżultati ta' test ta' bijodegradibiltà immedjata (ara metodu C.4).

1.5. VALIDITÀ TAT-TEST

Biex test ikun validu dawn il-kondizzjonijiet li ġejjin għandhom japplikaw:

— is-sopravivenza komplessiva tal-bajd fertilizzat fil-kontrolli, u fejn hu relevanti, fil-kontenituri ta' solvent biss, għandha tkun aktar jew daqs il-limiti definiti fl-Annessi 2 u 3,

— matul it-test, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu dissolt għandha tkun bejn 60 u 100 % tal-valur ta' l-arja saturata (ASV),

— it-temperatura ta' l-ilma m'għandhiex tvarja b'iktar minn ± 1,5 °C bejn il-kompartamenti divesri jew bejn ġranet suċċessivi waqt il-ħin tat-test u għandha tkun fil-limitu tas-sensiliet speċifikati ta' temperaturi għall-ispeċi użati fit-test (Annessi 2 u 3).

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Il-Kompartamenti tat-test**

Jista' jintuża kull tip ta' reċipjent tal-ħġieġ jew kimikament inerti. Id-dimensjonijiet tar-reċipjenti għandhom ikunu kbar biżżejjed sabiex ikunu konformi mar-rata ta' tagħbija (ara taqsima 1.7.1.2). Hu rakkomandat li l-kompartamenti tat-test ikunu pożizzjonati kif ġie ġie fil-post fejn ser isir it-test. Jekk fil-laboratorju jeżistu effetti sistematiċi kontrollabbli permezz ta' separazzjoni bi blokki, preferibilment għandu jintuża disinn sperimentali bi blokki ta' daqs irregolari fejn kull trattament ikun preżenti f'kull blokka, monflok ma jintuża disinn kompletament irregolari. Jekk jintuża il-metodu ta' għeluq, dan għandu jittieħed in konsiderazzjoni fl-analiżi sussegwenti ta' *data*. Il-kompartamenti tat-test għandhom ikunu imħarsa minn kwalunkwe interferenza.

1.6.2. **Selezzjoni ta' speċi ta' ħut**

Speċi ta' ħut rakkomandat huma mniżżla f'tabella 1A. Din ma tippermettix l-użu ta' speċi oħrajn (eżempji huma mogħtija f'tabella 1B), iżda il-proċedura tat-test tista tkun adattata sabiex tipprovdi kondizzjonijiet adattati għat-test. F'dan il-każ, ir-raġuni li tiġġustifika l-għażla ta' l-ispeċi u l-metodu esperimentali għandhom ikunu magħrufa.

1.6.3. **Trobbija tal-ħut riptoduttiv**

Dettalji fuq iż-żamma tal-ħut riproduttiv f'kondizjonijiet sodisfaċenti jinstabu f'OECD TG 210 ([1]) u f'referenzi (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4. **Immaniġġjar ta' embrijoni u larva**

Embrijoni u larva jistgħu ikunu esposti, fil-kontenitur ewlieni, f'kontenituri iżgħar bil-ġnub jew bit-truf miksija b'xibka sabiex jippermettu ċ-ċirkolazzjoni tas-sustanza tat-test madwar il-kontenitur. Wieħed jista jasal għal ċirkolazzjoni non turbolenti f'dawn il-kontenituri iżgħar billi jdendilhom ma' brazz b'tali mod li jkunu jistgħu jiċċaqalqu 'l fuq u 'l isfel iżda xorta waħda l-organi jibqgħu mgħarrqa; tista' tiġi użata wkoll sistema bis-sufun. Bajd iffertilizzat ta' ħut salmonidu jista' jiġi sistemati fuq xkafef jew xbieki b'fetħiet kbar biżżejjed li jippermettu il-bajd jgħaddu wara it-tfaqqis. Il-pipetti tat-tip pasteur huma l-aktar adattati għat-tneħħija ta' l-embrijoni u tal-larva fit-testijiet semistatiċi b'tiġdid kuljum ta' l-ilma (ara paragrafu 1.6.6).

Il-kontenituri, il-gradilji jew ix-xbieki li ntużaw biex iżommu l-bajd ġol-kontenitur ewlieni tat-test, għandhom jitneħħew wara li jfaqqsu l-larva ([1]), bl-eċċezzjoni li x-xbieki għandhom jitħallew sabiex iwaqqfu l-ħut milli jaħarbu. Jekk ikun hemmm il-bżonn li jiġu mċaqalqa il-larva, dawn m'għandhomx ikunu esposti għall-arja u m'għandhomx jintużaw xbiek biex jiġu mħarrba ħut mill-kontenituri tal-bajd (prekawzjoni bhal din tista ma tkunx neċessarja għal speċ inqas delikat bħal per eżempju il-carp). Il-ħin tat-trasferiment ivarja skond l-ispeċi u mhux dejjem ikun hemm bżonn ta' dan it-trasferiment. Għat-teknika semistatika jistgħu jintużaw buqari jew kontenituri baxxi, u jekk ikun hemm bżonn dawn ikunu armati b'xibka bħala paraventu kemm kemm 'il fuq mill-qigħ tal-buqar. Jekk il-volum ta' dawn il-kontenituri huwa biżżejjed sabiex jaqbel mal-bżonn tat-tagħbija, (ara 1.7.1.2) ma jkunx hemm bżonn ta' trasferiment ta' embrijoni u larva.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

▼B

1.6.5. **Ilma**

Kull ilma li jkun konformi mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma dilwit kif imniżżel f'Appendiċi 4 u ġo liema ilma l-ispeċi użata fit-test turi kapaċità ta' sopravivenza almenu daqs dik deskritta f'Appendiċi 2 u 3, huwa ilma tajjeb biex ikun użat fittest. L-ilma għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-tets. Il-pH għandha tjinżamm fil-limitu ta' ± 0,5 unità pH. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma dilwit ma jħallix effetti mhux mixtieqa fuq ir-riżultat tat-test (per eżempju taħwid tas-sustanza), jew kuntrarjament jaffettwa il-ħut riproduttiv, għandhom jittieħdu kampjuni biex jiġu analizzati regolarment. Qisien ta' metalli tqal (per eżempju. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd u Ni), anjoni u katjoni maġġuri (eż. Ca, Mg, Na, K, Cl u SO_4), pestiċidji (per eżempju pestiċidji b'organofosforu totali u organoklorin totali), karbon totalment organiku u solidi sopiżi għandhom ikunu magħmula kull tliet xhur, meta ilma tat-taħlit ikollu kwalità relattivament kostanti. Jekk il-kwalità ta' l-ilma tkun kostanti almenu għal sena, qatgħat deċiżivi jistgħu jkunu anqas frekwenti u l-intervalli jistgħu jkunu anqas frekwenti (per eżempju kull sitt xhur).

1.6.6. **Soluzzjonijiet tat-test**

Soluzzjonijet tat-test fuq il-konċentrazzjonijiet magħżula, huma preparati b'taħlit ta' soluzzjoni ewlenija.

Din is-soluzzjoni għall-ħażna għandha tkun preparata preferibilment billi is-sustanza tat-test titħallat u titħawwad ma' l-ilma b'mezzi mekkaniċi (per eżempju tqanqil u ultrasonikazzjoni). Sabiex tiġi milħuqa soluzzjoni konċentrata ewlenija, jistgħu jintużaw kolonni saturati (kolonni solubili). Sa fejn hu possibbli għandu jiġi evitat l-użu ta' solvents jew dipersants (aġenti solubilizzanti); madankollu, ċertu komposizzjonijiet jistgħu jiġu bżonnjużi f'ċerti każi sabiex tiġi prodotta soluzzjoni konċentrata xierqa. Eżempji ta' solvents adattati huma aċetun, ethanol, metanol, dimethylformamide u triethyleneglycol. Eżempji ta' dispersants adattati huma Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % and HCO-40. Meta jintużaw aġenti li jkollhom bijo-degradibbiltà mgħaġġla (per eżempju: aċetun) jew li jevaporaw malajr, wieħed irid juża kawtela peress li dawn jistgħu jikkawżaw problemi fil-kreazzjoni ta' batterja f'testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa. Meta jkun użat aġent solubbli, dan m'għandux iħalli l-ebda effett sinifikanti fuq is-sopravivenza u l-anqas xi effett negattiv fuq l-istadji inizjali ta' ħajja kif juri il-kontroll li jkun solvent biss. Madankollu, għandu jsir kull sforz biex jiġi evitat l-użu ta' materjal bħal dan.

Għat-teknika semi-statika jistgħu jintużaw żewġ proċeduri ta' tiġdid differenti; jew (i) li jiġu preparati soluzzjonijiet ġodda f'kontenituri nodfa u il-bajd ħaj u il-larva jiġu trasferiti delikatament fil-kontenituri ġodda li jkollhom fihom volum żgħir mis-soluzzjoni il-qadima, kif ukoll jiġi evitat li jiġu esposti għall-arja, jew (ii) l-oganiżmi tat-test jinżammu fil-kontenituri filwaqt li proporzjon (almenu tliet kwarti) mill-ilma tat-test jinbidel. Il-frekwenza ta' tiġdid ta' dan il-mezz ikun jiddependi fuq l-istabilità tas-sustanza ittestejata, iżda tiġdid kuljum ta' l-ilma huwa rakkomandat. Jekk minn testijiet preliminari ta' stabilità (ara sezzjoni 1.4) jirriżulta li l-konċentrazzjoni tas-sustanza ittestjata m'hijiex stabbli (jiġifieri barra mill-parametri 80-120 %, tal-konċentrazzjoni nominali jew inqas minn 80 % ta' tal-konċentrazzjoni imkejla inizjalment) waqt il-perjodu ta' tiġdid, jeħtieġ li jittieħed in-konsiderazzjoni l-użu ta' test b'ċirkolazzjoni kontinwa. Fi kwalunkwé każ jeħtieġ li jiġi evitat kull li jiġu stressjati il-larvae waqt li l-ilma jkun qed jiġġedded.

▼B

Testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa jirrikjedu sistema li kontinwament tiddispensa u tħallat is-soluzzjoni inizjali (per eżempju metering pump, proportional diluter, saturator system) biex ikunu jistgħu jipprovdi serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartamenti tat-test. T Ir-rati ta' ċirkolazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u ta'l-ilma għat-taħlit m'għandhomx ivarjaw b'iktar minn 10 % matul it-test. Rata ta' ċirkolazzjoni ekwivalenti almenu għall-volum ta' ħames kompartamenti tat-test għal 24 siegħa hija adattata (2).

1.7. PROĊEDURA

Fil-letteratura wieħed isib infornazzjoni utli fuq il-prestazzjoni ta' testijiet fuq l-embrijuni tal-ħut kif ukoll fuq it-testijiet ta' tossiċità ta' sac-fry, b'xi eżempji jinstabu wkoll fil-biblijografija inkluża ma' dan it-test (7) (8) (9).

1.7.1. **Kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.7.1.1. *Tul ta' Żmien*

Dan it-test għandu jibda preferibilment fi żmien 30 minuta wara li jkunu ġew iffertilizzati l-bajd. L-embrijoni għandhom jiġu mgħarrqa fis-soluzjoni tal-prova qabel jew eżatt wara li jkun beda l-istadju tal-qsim tal-blastodisc, imma dejjem qabel ma jkun beda l-istadju tal-gastrula. It-test ma jistax jinbeda immedjatament wara l-fertlizzazzjoni jekk il-bajd ikun ġej mingħand sorsi kummerċjali. Billi kull dewmien jista jinfluwenza serjament is-sensittività tat-test, it-test għandu jibda fi żmien tmien sigħat wara il-fertilizzazzjoni. Billi il-larva ma jingħatawx ikel waqt il-perjodu ta' espożizzjoni, it-test għandu jintemm eżatt qabel ma tkun inxtorbot il-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd fi kwalunkwe mill-kompartamenti li qed isiru t-testijiet fihom jew qabel ma jkunu jew imutu minħabba nuqqas ta' ikel. Id-dewmien jiddependi fuq l-ispeċi li qed tkun użata. F'l-Appendiċi 2 u 3 wieħed isib xi rakkomandazzjonijiet f'dan ir-rigward.

1.7.1.2. *Tagħbija*

In-numru ta' bajd fertilizzat għandu jkun biżżejjed sabiex jissodisfaw it-talbiet ta' l-istatistika. Dawn għandhom ikunu distribwiti kif ġie ġie fost it-trattamenti, u għal kull konċentrazzjoni għandhom jintużaw almenu 30 bajda fertilizzata imqassmin indaqs, (jew almenu ndaqs kemm jista' jkun billi jista' jkun diffiċli li jkollok gruppi ndaqs meta tkun qed tuża ċertu speċi) bejn almenu tliet kompartamenti replika. Ir-rata ta' tagħbija (bijomassa skond il-volum tas-soluzzjoni ittestjata) għandha tkun baxxa biżżejjed b'tali mod li tippermetti li tinżamm konċentrazzjoni ta' ossiġnu dissolt ta' almenu 60 % ASV mingħajr arjazzjoni. Huwa rakkomandat li għal testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa, ir-rata ta' tagħbija ma taqbiżx 0,5 g/l għal 24 siegħa u ma taqbiżx 5 g/l ta' soluzzjoni fi kwalunkwé ħin (2).

1.7.1.3. *Dawl u temperatura*

It-temperatura tal-fotoperjodu u ta' l-ilma għandha tkun waħda xierqa għall-ispeċi li qed ikunu ttestjati (Appendiċi 2 u 3). Biex tkun ikkontrollata it-temperatura ikun opportun li jintuża reċipjent tat-test miżjud.

▼B

1.7.2. **Konċentrazzjonijiet tat-test**

Normalment huma rikjesti ħames konċentrazzjonijiet tat-test li għandhom fattur ta' differenza kostanti u li ma jaqbiżx it-3,2. Fl-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet tat-test wieħed għandu jieħu in-konsiderazzjoni il-kurva li tirrelata l-LC50 mal-perjodu ta' espożizzjoni fl-istudju ta' tossiċità qawwija. F'xi ċirkostanzi, bħal per eżempju f'testijiet tal-limitu, ikun aktar adattat li jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet kif ukoll l-intervall ta' konċentrazzjonijiet ikun aktar ristrett. Trid tingħata spjegazzjoni jekk jintużaw anqas minn ħames konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet b'sustanza għola minn LC_{50} f'69 siegħa jew 100mg/1, bl-ebda differneza għal liema hija l-aktar baxxa, m'għandhomx għalfejn jiġu ttestjati. Is-sustanzi m'għandhomx ikunu ittestjati fl-ilma tat-test 'il fuq mil-limitu ta' solubilità tagħhom.

Meta aġent solubilizzanti ikun użat biex jgħin fil-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet għat-test (ara sezzjoni 1.6.6), il-koċentrazzjoni finali fir-reċipjenti tat-test m'għandhomx ikunu aktar minn 0,1 ml/l u għandu jkun l-istess fir-reċipjenti kollha.

1.7.3. **Kontrolli**

Aparti il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ittestjata, irid jiġi ippreparat ukoll kontroll bl-ilma għat-taħlit (ripetuta skond il-bżonn) u eventwalment kontroll ukoll bl-ilma li fih l-aġent solubilizzanti (ripetut skond il-bżonn).

1.7.4. **Frekwenza tad-determinazzjonijiet u qisien analitiċi**

Waqt it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza huma determinati f'intervalli regolari.

Huwa rakkomandat li f'testijiet semi-statiċi, il-konċentrazzjoni tat-test, li mistennija tibqa' fl-iskala ta' ± 20 % tal-valur nominali, (i.e. bejn 80-120 %; ara sezzjoni 1.4 u 1.6.6), l-għola u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test, ikunu analizzati meta jkunu għadhom kif ġew preparati u immedjatament qabel it-tibdil ta' l-ilma almenu tliet darbiet imqassmin tul il-perjodu tat-test (i.e. l-analiżi għandhom jiġu effettwati fuq kampjun ta' l-istess soluzzjoni li tkun għadha kemm ġiet ippreparata u wara fil-mument li ser tkun ħa tinbidel).

Huwa neċessarju li fil-każi ta' testijiet fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza li qed tiġi ittestjata m'hix mistennija li tibqa fil-limitu ta' ± 20 % tal-valur nominali (fuq il-bażi ta' data fuq l-iatbilità tas-sustanza) jiġu analizzati il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test, eżatt meta jkunu għadhom kif ġew preparati u kif ikunu qed jinbidlu, iżda tinżamm l-istess skema (i.e. fi tliet okkażjonijiet imqassma mat-test kollu). Id-determinazzjoni tas-sustanza ittestjata qabel it-tiġdid tas-soluzzjoni, għandha ssir fuq replika tar-reċipjent għal kull konċentrazzjoni tat-test. L-intervalli ta' bejn id-determinazzjonijiet ma jridux ikunu aktar minn sebat ijiem. Huwa rakkomandat li ir-riżultati ikunu ibbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk ikun hemm evidenza li turi li l-konċentrazzjoni tas-sustanza ittestjata fis-soluzzjoni hi fil-limitu ta' ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-konċentrazzjoni mkejla inizjalment matul it-test, allura ir-riżultati jistgħu ikunu bażati fuq valuri nominali jew fuq valuri imkejla inizjalment.

Għal testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa, l-użu ta' reġim ta' kampjuni simili għal dak deskritt għal testijiet semistatiċi hu adattat (iżda f'dan il-każ, il-qisien ta' soluzzjonijiet antiki ma japplikawx). Madankollu, jekk it-test idum aktar minn sebat ijiem, huwa rakkomandat li jiżdiedu l-okkażjonijiet meta jittieħdu kampjuni (eż. tliet settijiet ta' qisien) biex tkun żgurata l-istabilità tal-konċentrazzjonijiet ittestjati.

▼B

Jista' jagħti l-każ li il-kampjuni jkollhom bżonn li jiġu separati jew iffiltrati (Eż. billi jintużaw pori ta' daqs 0,45 im). Madankollu, billi la s-separazzjoni u l-anqas il-filtrazzjoni ma jidher li dejjem jisseparaw il-frazzjoni non bijodisponibbli tat-test minn dik bijodisponibbli, il-kampjuni jistgħu ma jiġux suġġetti għal dawk it-trattamenti.

Waqt it-test, l-ossiġnu dissolt, il-pH u it-temperatura, għandhom jiġu mkejla f'kull reċipjent tat-test. L-ebusija kif ukoll is-salinità (jekk relevanti) totali, għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed li jkollu l-ogħla konċentrazzjoni. L-ossiġnu u is-salinità (jekk relevanti), għandhom jitkejlu minimament tliet darbiet (fil-bidu, fin-nofs u fl-aħħar tat-test). Huwa rakkomandat, li f'testijiet semi-statiċi, l-ossiġnu dissolt jiġi mkejjel aktar spiss, preferibiliment qabel u wara kull tiġdid ta' l-ilma, jew almenu darba fil-ġimgħa. Il-pH, f'testijiet semi-statiċi, għandha tiġi mkejla fil-bidu u fl-aħħar ta' kull tiġdid ta' l-ilma u ta' l-inqas darba fil-ġimgħa fil-każ ta' testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa. L-ebusija għandha tkun imkejla darba f'kull test. It-temperatura għandha titkejjel kuljum u preferibilment għandha tkun osservata kontinwament almenu f'kompartament wieħed tat-test.

1.7.5. **Osservazzjonijiet**

1.7.5.1. *Stadju ta' żvilupp embrijoniku*

L-istadju embrijoniku (i.e. embriju fl-ewwel stadju ta' żvilupp) fil-bidu ta' l-espożizzjoni tas-sustanza ittestjata, għandu jkun verifikat kemm jista' jkun bi preċiżjoni. Dan jista' jsir billi jintuża kampjun rappreżentattiv tal-bajd li jkun preżervat u separat kif jixraq. Għal deskrizzjoni u xbiehat ta' l-istadji embrijoniċi wieħed jista' jirreferi għall-letteratura (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Tfaqqis u sopravvivenza.*

Ta' l-inqas darba kuljum, għandhom isiru oservazzjonijiet, kif ukoll jiġu dokumentati ċ-ċifri tat-tfaqqis u tas-sopravivenza. Jista' jagħti l-każ li jkunu jridu jsiru osservazzjonijiet aktar frekwenti fil-bidu tat-test (eż. kull 30 minuta matul l-ewwel tliet sigħat) billi f'ċerti każi dawn jista' jkollom aktar relevanza milli n-numru ta' mwiet biss (eż. meta hemm effetti tossiċi qawwijin). Embirijoni u larva mejta għandhom jitneħħew hekk kif jiġu innutati billi dawn jitħassru malajr. Wieħed għandu joqgħod ferm attent meta jkunu qed jitneħħew individwi mejta li ma jitlaqqgħux jew issir xi ħsara lill-bajd/larva ta' ħdejhom billi dawn huma delikati ħafna. Ir-raġunijiet tal-mewt ivarjaw skond f'liema stadju ta' ħajja jkunu:

— għal bajd: partikolarment fl-istadji tal-bidu, nuqqas notevoli ta' traslużiditá u bidla fil-kulur, kawża ta' koagulazzjoni li twassal għal dehra bajda mċajpra,

— għal embrijoni: nuqqas ta' ċaqliq tal-ġisem u/jew nuqqas ta' taħbit tal-qalb u/jew tidnis imċajpar tal-kulur fi speċi li l-embrijoni tagħhom huma normalment trasparenti,

— għal larva: immobilità u/jew nuqqas ta' movement respiratorju u/jew nuqqas ta' taħbit tal-qalb u/jew is-sistema ta' nervituri ċentrali ssir ta' kulur abjad imċajpar u/jew nuqqas ta' reazzjoni fl-istimolu mekkaniku.

▼B

1.7.5.3. *Aspett anormali*

In-numru ta' larva li juru anormalitajiet fil-forom tal-ġisem u/jew pigmentazzjoni, u l-istadju ta' assorbiment tal-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar ta' bajda, għandhom ikunu dokumentati f'inetrvalli adekwati skond it-tul tat-test kif ukoll in-natura ta' l-anormalità deskritta. Ta' min jinnota li embrijoni u larva anormali huma fenomenu naturali u fil-kontroll(i) ta' xi speċi jsitgħu jlaħħqu ħafna punti perċentwali. Annimali anormali għandhom jitneħħew mir-reċipjenti tat-test, meta jmutu biss.

1.7.5.4. *Imġieba anormali*

Anormalitajiet, bħal per eżempju teħid tan-nifs mgħaġġel ħafna, għawm mhux koordinat, u inattività atipiku għandhom jiġu dokumentati f'intervalli adekwati skond it-tul tat-test. Dwan l-effetti, għalkemm diffiċli biex jiġu kwanitifikati, meta jkun osservati, jistgħu jgħinu fl-interpretazzjoni ta' l-informazzjoni fuq l-imwiet, jiġifieri, jipprovdu informazzjoni fuq il-mod ta' azzjoni tossika tas-sustanza.

1.7.5.5. *Tul*

Fi tmiem it-test, huwa rakkomandat li jitkejlu it-tulijiet ta' kull individwu u jistgħu jintużaw qisien standard, mifrudin jew tat-tul totali. Madankollu, jekk il-ġewnaħ tad-denb titħassar jew titħaffer, għandhom jintużaw qisien standard. Ġeneralment, f'testijiet immexxija tajjeb, il-koeffiċjent tal-varjazzjoni fit-tul fost ir-repliki fil-kontrolli għandu jkun ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Piż*

Fl-aħħar tat-test, jistgħu jitkejlu il-piżijiet individwali; il-piżijiet xotti (24 siegħa f60 °C) huma preferuti minn dawk umduži (wara li jkunu ġew ixxuttati). Ġeneralment, ftestijiet immexxija tajjeb, il-ko-effiċjent tal-varjazzjoni fil-piż fost ir-repliki fil-kontrolli għandu jkun ≤ 20 %.

Dawn l-osservazzjonijiet iwasslu sabiex l-informazzjoni mogħtija hawn tkun għad-dispożizzjoni ta' statistika analitika:

— mwiet kumulattiv,

— numru ta' larva b'saħħita fl-aħħar tat-test,

— ħin biex jibda u jispiċċa it-tfaqqis (i.e. 90 % ta' tfaqqis fir-repliki),

— numru ta' larva li jfaqqsu kuljum,

— tul (u qies) ta' annimali li baqgħu ħajjin fi tmiem it-test,

— numru ta' larva li huma deformati jew b'apparenza anormali,

— numru ta' larva li qed juru imġieba anormali.

▼B

2. ***DATA* U RAPPURTAĠĠ**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Huwa rakkomandat li l-istatistiku jkun involut kemm fid-disinn kif ukoll fl-analiżi tat-test billi il-metodu jħalli lok għal varjazzjoni konsiderevoli fl-esperiment fid-disinn, per eżempju fin-numru ta' kompartamenti tat-test, fin-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' bajd fertilizzat li ser jibda bih u fil-parametri mkejla. Fid-dawl ta' dawn l-alternativi fid-disinn tat-test, gwisda speċifika fuq il-proċeduri statistiċ i m'humiex mogħtija hawn.

Jekk ser jiġu kalkolati l-LOEC/NOEC allura jkun hemm bżonn li l-varjazzjonijiet jiġu analizzati f'kull sett ta' repliki billi tintuża l-analiżi tal-varjazzjoni (ANOVA) jew proċeduri ta' tabelli kontinġenti. Il-metodu ta' Dunnett jista' jkun utli (12) (13) sabiex isir tqabbil bejn ir-riżultati f'konċentrazzjonijiet individwali u r-riżultati fil-kontrolli. Huma wkoll disponibbli eżempji oħra utli (14) (15). Id-daqs ta' l-effett li jiġi identifikat meta jintuża l-metodu u proċeduri oħra, (i.e. il-qawwa tat-test) għandu jkun kalkolat u dokumentat. Għandu jkun innutat li mhux kull osservazzjoni mniżżla f'taqsima 1.7.5.6 hija adattata għal analiżi ta' statsitika bil-metodu ANOVA. Per eżempju, mwiet kumulattiv u n-numru ta' larva b'saħħitha fit-tmiem tat-test, jistgħu jiġu analizzati b'metodi ta' probit.

Jekk se jkunu kalkolati LC/EC_xs, iridu jkunu mdaħħla fid-*data* kurva(i) adattata(i) bħall-kurva loġistika, billi jintuża metodu statistiku bħal kaxxi minimi jew kaxxi minimi li mhux linejari. Il-kurva(i) għandha(hom) tkun(u) mqieghda f'parametri sabiex l-LC/EC_x interessata u l-iżball standard tagħha jista' jkun kalkolat direttament. Dan iħaffef ħafn aktar il-kalkoli tal-limiti ta' kunfidenza madwar l-LC/EC_x. Sakemm ma jkunx hemm motivi sabiex jiġu preferiti livelli affidabbli differenti, għandha tiġi kwotata 95 % ta' kunfidenza b'żewġ livelli. Preferibilmet, il-proċedura ta' adattament għandha tipprovdi mezz biex jiġi valutat is-sinifikat tan-nuqqas ta' addattament. Jistgħu jintużaw metodi grafiċi għal kurvi xierqa. Analiżi rigressiva hi adattata għall-osservazzjonijiet kollha mniżżla f'taqsima 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Ir-riżultati għandhom ikunu trattati b'kawtela fil-każijiet ta' meta fis-soluzzjonijiet tat-test jitkejlu konċentrazzjonijiet ta' sustanzi tossiċi fil-limitu ta' osservazzjoni tal-metodu analitiku. L-interpretazzjoni tar-riżultati ta' koċentrazzjonijiet 'il fuq mil-livell ta' solubilità tas-sustanza, għandha ssir b'kawtela wkoll.

2.3. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi din l-informazzjoni:

2.3.1. **Sustanza tat-test:**

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżiċi relevant ital-kimika,

— fejn relevanti, l-identifikazzjoni kimika tad-*data*, inklużi l-purità u l- metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza ttestjata.

▼B

2.3.2. **Speċi ittestjati:**

— l-isem xjentifiku, il-purità, in-numru ta' ħut riproduttiv (jiġifieri kemm intużaw speċi femminili biex ġew prodotti in-numru ta' bajd fertilizzat li ġie użat fit-test), minn fejn oriġinaw u l-metodu ta' kollezzjoni tal-bajd fertilizzat u manipulazzjoni suċċessiva.

2.3.3. **Kondizzjonijiet tat-test:**

— proċedura użata fit-test (eż. semistatika jew b'ċirkolazzjoni kontinwa, perjodu ta' ħin mill-fertilizzazzjoni sal-bidu tat-test, manipulazzjoni, eċċ),

— fotoperjodu(i),

— disinn tat-test (eż. numru ta' kompartamenti tat-test u repliki tagħhom, numru ta' embrijoni replikati),

— metodu ta' preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ta' ħażna u l-frekwenza ta' tiġdid (l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjonijiet tiegħu għandhom jingħataw meta jiġu użati),

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-valuri mkejla kif ukoll il-medja u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu ta' kif dawn jintlaħqu u jekk is-sustanza ttestjata tinħallx fl-ilma b'konċentrazzjonijiet inqas minn dawk ittsetjati, għandhom jiġu provduti sabiex il-qisien jirreferu għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ttestjata fis-soluzzjoni,

— karatteristiċi ta' l-ilma mħallat: p pH, soliditá, temperatura, konċentrazzjoni ta' ossiġnu dissolt, livelli ta' klorin residwu (jekk ġie mkejjel) karbon organiku totali, suspended solids, salinità tal-mezz ittestjat (jekk ġie mkejjel) u kwalunkwe qies ieħor,

— kwalità ta' l-ilma fil-reċipjenti tat-test: pH, soliditá, temperatura u konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul.

2.3.4. **Riżultati:**

— riżultati minn studji preliminary fuq l-istabilità tas-sustanza ittestjata,

— xiehda li l-kontrolli jikkorrispondu ma' l-istandard ta' sopravivenza aċċettabbli ta' l-ispeċi ittestjati (Appendiċi 2 u 3),

— data fuq mortalità/sopravivenza fl-istadju ta' embrijun u larva kif ukoll mortalità u sopravivenza komplessiva,

— ġranet biex ifaqqsu u kwantità

— ġranet biex ifaqqsu u kemm faqqsu – data għal tul (u piż),

— incidenza u deskrizzjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi, jekk jeżistu,

— incidenza u deskrizzjoni ta' effetti ta' mġieba, jekk jeżistu,

— analiżi statistika u trattament tad-data,

— għal testijiet li użaw l-ANOVA, l-inqas konċentrazzjoni b'effetti sinjifikanti (LOEC) F'P=0,05 f' konċentrazzjoni massima mingħajr effetti sinjifikattivi (NOEC) għal kull risposta analizzata, inkluż deskrizzjoni tal-proċeduri statistiċi utilizzati u indikazzjoni ta' l-entità ta' l-effett li seta' ġie individwat,

▼B

— għal testijiet li użaw it-teknika rigressiva, l-LC/ECx u intervalli ta' kunfidenza u deskrizzjoni grafika tal-mudell użat għall-kalkolazzjoni tiegħu,

— spjegazzjoni għal kull devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ittestjar.

3. **REFERENZI**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Comunities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). it-temperatura Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (Brachydanio rerio) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist.. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Test Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon jew Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, Brachydanio rerio. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, Oryzias latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (Oryzias latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Tabella 1A

Speċi ta' ħut rakkomandat għat-test

Ilma Ħelu
Oncorhynchus mykiss Rainbow trout (9)(16)
Danio rerio Zebrafish (7)(17)(18)
Cyprinus caprio Karpjun komuni (8)(19)
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka (20)(21)
Pimephales promelas Fathead minnow (8)(22)

▼B

Tabella 1B

Eżempji ta' speċi oħra dokumentati tajjeb li ġew użati

Ilma Ħelu	Ilma Mielaħ
Carassius auratus Goldfish (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23)(24)(25)
Lepomis macrochirus Bluegill (8)	*Clupea harengus* Herring (24)(25)
	Gadus morhua Merluzz (24)(25)
	Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (23)(24)(25)

▼B

ANNESS 1

GWIDA FUQ IL-PRESTAZZJONI TA' TEST TA' TOSSIĊITÀ FUQ EMBRIJONI U SAC-FRY TA' ZEBRAFISH (*BRACHYDANIO RERIO*)

DAĦLA

Iż-zebrafish toriġina mill-kosta ta' Coromandel fl-Indja fejn tgħix fi xmajjar b'kurrent mgħaġġel ta' ilma. Hija ħuta komuni ta' l-akwarju li tappartjeni għall-familja tal-carp, u informazzjoni dwar il-proċeduri għal ħarsien u l-kultura tagħha tista' tinstab f'kotba standard dwar ħut tropikali. Il-bijoloġija u l-użu tagħha għal riċerka ta' sajd kienu riveduti minn Laale (1).

Il-ħuta rari tkun itwal minn 45 mm. Il-ġisem hu ta' forma ċilindrika b' 7-9 strixxi orizzontali ta' lewn blu skur arġentat. Dawn l-istrixxi jkopru l-ġwienaħ tal-ġenb u ta' wara. Id-dahar huwa ta' lewn aħdar kulur iż-żebbuġa. L-irġiel huma rqaq min-nisa. In-nisa ileqqu aktar u żaqqhom hi aktar mitluqa partikolarment qabel ma jbidu.

Il-ħut adult hu kapaċi jittollera varjazzjonijiet kbar fit-temperatura, pH u ebusija. Madankollu, għandhom ikunu provduti kondizzjonijiet ottimali biex ikun hemm ħut f'saħħtu li jipproduċi bajd ta' kwalità.

Waqt li l-mara tkun qed tbid, ir-raġel jiġri warajha u jtiha bir-ras, u l-bajd ikun fertilizzat hekk kif ikun ħiereġ. Il-bajd, li hu trasparenti u ma jwaħħalx, jaqgħu fil-qiegħ fejn jistgħu jiġu mittiekla mill-ġenituri stess. Il-proċess ta' meta l-ħuta tbejjed jiġi influwenzat mid-dawl. Jekk id-dawl ta' filgħodu jkun adattat, il-ħut ġeneralment ibejjed fis-sigħat bikrin ta' wara s-sebħ.

Ta' kull ġimgħa, mara tista' tipproduċi lottijiet ta' diversi mijiet ta' bajd.

KONDIZZJONIJIET TA' ĦUT RIPRODUTTIV, RIPRODUZZJONI U STADJI TAL-BIDU TAL-ĦAJJA

Agħżel numru adegwat ta' ħut f'saħħtu u żommhom f'ilma adattat (eż. Appendiċi 4) almenu għal ġimgħatejn qabel it-tqegħid ta' bajd proġettat. Il-grupp ta' ħut għandu jitħalla jirriproduċi ta' l-anqas darba qabel ma jipproduċu il-lott ta' bajd użat fit-test. Id-densità ta' ħut f'dan il-perjodu ma jridx ikun aktar minn gramma ta' ħut għal kull litru. Tibdil regolari ta' l-ilma jew l-użu ta' sistemi ta' purifikazzjoni jippermettu li din id-densità tkun ogħla. It-temperatura fit-tankijiet li qed jinżammu fihom għandha tinżamm sa 25 ± 2 °C. Il-ħut għandu jkollu dieta varjata, li tista' tikkonsisti minn per eżempju ikel kummerċjali niexef, Arthemia mfaqqsa friska, chironomids, Daphnia, dud abjad (Enchytraeids).

Żewġ proċeduri li fil-prattika wasslu għal-lott suffiċjenti ta' bajd f'saħħtu u fertiliizzat sabiex ikun kondott test huma spjegati hawn taħt:

Tmien nisa u 16-il raġel huma mitfugħa f'tank l-i fih 50 litru ta' ilma għat-taħlit, protett minn dawl direct u mitluqa kemm jista jkun mingħajr ma jiġu disturbati għal almenu 48 siegħa. Tilar biex fih isir it-tqegħid ta' bajd huwa mqiegħed fil-qigħ ta' l-akwarju wara nofsinhar fil-ġurnata ta' qabel jibda t-test. Dan it-tilar jikkonsisti fi gwarniċ (ħġieġ plexi jekk materjal adattat ieħor), għoli 5-7 ċm u b'xibka ħarxa ta' 2-5 mm mwaħħla ma' fuq u xibka fina ta' 10-30 µm mal-qiegħ. Max-xibka l-ħarxa nsibu diversi "siġar tat-tqegħid ta' bajd", magħmulin minn ħabel tan-najlon maħlul. Wara li l-ħut ikunu tħallew fid-dlam għal 12-il siegħa, jinxteħel dawl baxx biex jingħata bidu għat-tqegħid ta' bajd. 2-4 sigħat wara it-tqegħid ta' bajd, it-tilar li fih ibidu jitneħħa u jinġabru l-bajd. Dan it-tilar iċaħħad il-ħut milli jieklu l-bajd u jiffaċilita wkoll il-ġbir tal-bajd. Il-grupp ta' ħut għandhom ikunu biedu ta' l-inqas darba qabel it-tqegħid ta' bajd li jintuża fit-test.

▼B

5-10 ħutiet maskili u femminili huma mqiegħda individwalment ta' l-inqas ġimgħatejn qabel it-tqegħid ta' bajd. Wara 5-10 ijiem, iż-żaqq tan-nisa tkun tidher mitluqa u il-papillae ġenitali tagħhom ikunu viżibbli. Ħut maskili m'għandhomx papillae. It-tqegħid ta' bajd isir f'tankijiet apposta armati b'xibka falza fil-qiegħ (kif deskritt hawn fuq). It-tank hu mimli b'ilma għat-taħlit, sabiex il-fond ta' l-ilma 'il fuq mix-xibka jkun ta' 5-10 ċm. Mara waħda u żewġt irġiel huma mqiegħda fit-tank ġurnata qabel it-tqegħid pjanat. It-temperatura ta' l-ilma tiżdied gradwalment bi grad wieħed għola mit-temperatura akklimatizzanti. Id-dawl jintefa u possibilment it-tank jitħalla mingħajr ma jkun disturbat kemm jista' jkun. Filgħodu jinxtegħel dawl baxx sabiex jinbed it-tqegħid ta' bajd. Sa 2-4 sigħat wara il-ħut jitneħħa u l-bajd jinġabar. Jekk ikun hemm bżonn ta' lottijiet ikbar ta' bajd minn dak l-ammont li tista' tipproduċi mara waħda, allura jistgħu jiġu preparati numru suffiċjenti ta' tankijiet għat-tqegħid ta' bajd fl-istess ħin. Meta is-suċċess tar-riproduzzjoni ta' nisa individwali qabel it-test (daqs tal-lott u l-kwalità)jiġi dokumentat, dawk in-nisa bl-għola rata ta' suċċess riproduttiv, jistgħu ikunu magħżula għar-riproduzzjoni.

Il-bajd għandhom ikunu trasferiti għal ġor-reċipjenti tat-test permezz ta' tubi tal-ħġieġ (id-dijametru minn ġewwa m'għandux ikun inqas minn 4mm) fornuti bi flexible suction bulb. L-ammont ta' ilma li fih jitpoġġew il-bajd biex jiġu trasferiti għandu jkun minimu kemm jista' jkun. Il-bajd huma itqal mill-ilma u jistgħu joħorġu minn ġot-tubi. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat li l-bajd (u l-larva) jiġu f'kuntatt ma' l-arja. Għandu jsir eżami mikroskopiku tal-kampjun(i) tal-lott(ijiet) sabiex jiġi żgurat li m'hemm l-ebda irregolarità fl-ewwel stadji ta' l-iżvilupp. Diżinfezzjoni tal-bajd mhux permess.

Ir-rata ta' mwiet fost il-bajd tkun l-ogħla fl-ewwel 24 siegħa wara l-fertilizzazzjoni. Mortalità ta' 5-40 % hi normali f'dan il-perjodu. Il-bajd jidde-ġenera bħala riżultat ta' falliment fil-fertilizzazzjoni jew fl-iżvilupp. Il-kwalità tal-lott jiddependi fuq il-ħut nisa billi certu nisa jipproduċu bajd ta' kwalità tajba filwaqt li oħrajn qatt ma jipproduċu bajd ta' kwalità. Anke ir-rata ta' żvilupp u r-rata ta' tfaqqis tvarja minn lott għall-ieħor. Il-bajd fertilizzat b'suċċess u l-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd jgħixu sew, normalment 'il fuq minn 90 %. F'25 °C il-bajd ifaqqas 3-5 ijiem wara l-fertilizzazzjoni u l-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd tkun assorbita bejn wieħed u ieħor 13-il ġurnata wara l-fertilizzazzjoni.

L-iżvilupp embrijoniku kien definit tajjeb minn Hisaoka u Battle (2). Minħabba it-trasparenza tal-bajd u tal-larva wara it-tfaqqis, jista' jiġri li l-iżvilupp tal-ħut ikun segwit minn preżenza ta' malformazzjonijiet. Bejn wieħed u ieħor erba' sigħat wara it-tqegħid ta' bajd, il-bajd mhux fertilizzat ikun jingħaraf minn dak fertilizzat (3). Għal dan l-eżami, il-bajd u l-larva jitpoġġew f'kompartamenti b'volum baxx u studjati taħt mikroskopju.

Il-kondizzjonijiet tat-test, li japplikaw għall-istadji ta' bidu tal-ħajja huma mniżżla f'Appendiċi 2. Valuri ottimali tal-pH u ta' l-ebusija ta' l-ilma tat-taħlit huma 7,8 u 250 mg $CaCO_3$/l rispettivament.

KALKOLAZZJONIJIET U STATISTIKA

Hu propost metodu b'żewġ stadji. L-ewwel, id-data fuq il-mortalità, żvilupp anormali u l-ħin tat-tfaqqis huma analizzati statistikament. Wara, it-tul tal-ġisem ta' dawk il-konċentrazzjonijiet f'liema ma kien hemm l-ebda effett kuntrarju fuq l-ebda minn dawn il-parametri, hu evalwat statistikament. Dan l-approċċ huwa rakkomandat billi it-tossikant jista' joqtol ħut iżgħar, itawwal il-ħin għat-tfaqqis u jwassal għal malformazzjonijiet kbar u sussegwentement jinfluwenza il-kejl ta' tul. F Barra minn dan, ser ikun hemm bejn wieħed u ieħor l-istess ammont ta' ħut biex ikunu mkejla għal kull trattament, sabiex tiġi assigurata il-validità ta' l-istatistika tat-test.

▼B

DETERMINAZZJONIJIET TA' L-LC_{50} U EC_{50}

Il-persentaġġ ta' bajd u larva sopraviventi huwa kalkolat u tiġi koreġuta abbażi tal-mortalità fil-kontrolli skond il-formola ta' Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

billi,

P = % ta' sopravivenza korretta

P' = % ta' sopravivenza osservata fil-konċentrazzjoni tat-test

C = % sopravivenza fil-kontroll

Jekk hu possibbli, l-LC_{50} tiġi determinata b'metodu adattat fi tmiem it-test.

Jekk hi mixtieqa l-inklużjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi fl-istatistika ta' l-EC_{5O}, wieħed jista' jsib gwida għal dan fi Stephan (5).

STIMA TA' LOEC U NOEC

L-għan tat-test fuq il-bajd u s-sac-fry huwa li jqabbel konċentrazzjonijiet diversi miz-zero mal-kontroll, u allura jiġi determinat l-LOEC. Għalhekk għandhom jiġu utilizzati diversi proċeduri ta' tqabbil (6) (7) (8) (9) (10).

REFERENZI

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statis. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

▼B

ANNESS 2

KONDIZZJONIJIET TAT-TEST, DEWMIEN U KRITERJI TA' SOPRAVIVENZA GĦAL SPEĊI RAKKOMANDATI

Speċi	Temp (°C)	Salinità (0/00)	Fotoper jod (sigħat) (hrs)	Dewmien fl-istadji (ġranet)		Dewmien tipiku tat-test	Sopravivenza tal-Kontroll (% minimu)	
				embrijo	Sac-fry		Suċċess fit-tfaqqis	Perjodu ta' wara t-tfaqqis
ILMA ĦELU								
Brachydanio rerio Zebrafish	25 ± 1	—	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Appena wara l-fertilizzazzjoni (fil-bidu ta' l-istadju tal-gastrula) sa ħamest ijiem wara it-tfaqqis (8-10 ijiem)	80	90
Oncorhynchus mykiss Rainbow trout	10 ± 1 (1) 12 ±1 (2)	—	0 (a)	30 – 35	25 – 30	Appena possibbli wara il-fertilizzazzjoni (fil-bidu ta' l-istadju tal-gastrula) sa 20 ġurnata wara t-tfaqqis (50-55 ġurnata)	66	70
Cyprinus carpio Karpjun komuni	21 – 25	—	12 – 16	5	> 4	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (8-9 ġranet)	80	75
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 5 ijiem wara it-tfaqqis (13-16-il ġurnata)	80	80
Pimephales promelas Fathead minnow	25 ± 2	—	16	4 – 5	5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (8-9 ġranet)	60	70

(1) Għall-embrijoni.
(2) Għall-*larvae*.
(a) Dlam għall-embrijoni u għal-*larvae* sa ġimgħa wara t-tfaqqis ħlief meta jkunu spezzjonati. Imbagħad dawl baxxa matul it-test.

▼B

ANNESS 3

Kondizzjonijiet tat-test, dewmien u kriterji għal sopravivenza ta' speċi oħra dokumentati tajjeb

Speċi	TEMP (^{0}C)	Salinità (0/00)	Fotoperjod (sigħat) (hrs)	Dewmien fl-istadji (ġranet)		Dewmien tipiku tat-test	Sopravivenza tal-Kontroll (% minimu)	
				embrijo	SAC-FRY TEST		Suċċess tat-tfaqqis	Wara t-tfaqqis
ILMA ĦELU								
Carassius auratus Goldfish	24 ± 1	—	—	3 – 4	> 4	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (7 ġranet)	—	80
Leopomis macrochirus Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (7 ġranet)	—	75
ILMA MIELAĦ								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22 -25	15 – 22	12	1,5	10	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 5 ijiem wara it-tfaqqis (6-7 ġranet)	80	60
Clupea harengus Herring	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 3 ijiem wara it-tfaqqis (23-27 ġranet)	60	80
Gadus morhua Cod	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 3 ijiem wara it-tfaqqis (18-il ġurnata)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15 – 30	12	—	—	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4/7 ijiem wara it-tfaqqis (28 ġurnata)	> 75	80

▼B

ANNESS 4

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA GĦAT-TAĦLIT AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjoni
Materja ta' partiċelli	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhix ionizzata	< 1 µg/l
Klorina residwali	< 10 µg/l
Pestiċidi organophosphorus totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organophosphorus totali u polychlorinated biphenyls	< 50 ng/l
Klorina organika totali	< 25 ng/l

▼B

C.16. NAĦAL – PROVA TA' TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA

1. METODU

Dan il-metodu ta' prova ta' tossiċità akuta huwa replika ta' l-OECD TG 213 (1998).

1.1. DAĦLA

Din il-prova ta' tossiċità hija metodu li tintuża fil-laboratorju, magħmul biex issir stima tat-tossiċità orali akuta tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti u kimiċi oħra, lin-naħal adult li jkun qiegħed jaħdem.

Fl-istima u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' tas-sustanzi, d-determinazzjoni ta' tossiċità akuta orali fin-naħal tista' tukun meħtieġa, e.ż. meta jkun probabbli li n-naħal ġie espost għal xi kimika. Din il-prova ta' tossiċità orali akuta ssir sabiex tiġi determinata it-tossiċità intrinsika ta' pestiċidi u kimiċi oħra għan-naħal. Ir-riżultati ta' din il-prova għandhom jintużaw biex jiġi definit il-bżonn għal evalwazzjoni ulterjuri. B'mod partikolari, dan il-metodu jista' jintuża f'programmi mqassma f'aktar minn fażi waħda sabiex jiġu determinati il-ħsarat tal-pestiċidi għan-naħal, ibbażat fuq sekwenza ta' provi ta' tossiċità ġol-laboratorju għal-esperimenti fuq is-semi-kamp u fuq il-kamp (1). Il-pestiċidi jistgħu jiġu ittestjati bħala sustanzi attivi (s.a.) jew bħala prodotti fformulati.

L-istandard tossiku għandu jiġi stabbilit sabiex tiġi vverifikata s-sensittività tan-naħal u l-preċiżjoni tal-prova proċedurali.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċità orali akuta: hija l-effett avvers li jseħħ f'perjodu massimu ta' 96 siegħa (s) ta' amministrazzjoni orali ta' dosa singola ta' sustanza sperimentali.

Doża: hija l-ammont tas-sustanza ikkonsmata. Id-doża hija espressa bħala l-massa (μg) tas-sustanza sperimentali għal kull annimal sperimentali (μg/bee). L-ammont reali għal kull naħla ma jistax jiġi kkalkolat peress li n-naħal jintema' kollettivament, imma tista' ssir stima tad-doża medja (it-total tas-sustanza sperimentali kkonsmata/in-numru ta' naħal sperimentali f'kull gaġġa).

LD_{50} (doza letali medja) orali: hija doża singola ta' sustanza miġjuba statistikament li tista' tikkawża l-mewt f'50 % ta' l-annimali meta tiġi somministrata oralment. Il-valur ta' l-LD_{50} huwa espress bħala μg tas-sustanza sperimentali kull naħla. Fil-każ tal-pestiċidi, is-sustanza sperimentali tista' tkun kemm sustanza attiva (s.a.) kif ukoll prodott formulat li jkunu fih wieħed jew aktar sustanzi attivi.

Mortalità: annimal huwa registrat mejjet meta ikun kompletament immobbli.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-PROVA

Naħal ħaddiema adulti (*Apis mellifera*) huma esposti għal firxa ta' dożijiet tas-sustanza sperimentali imferrxa f'soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal imbagħad jintema' bl-istess dieta, libera mis-sustanza sperimentali. Matul mill-anqas 48 s il-mortalità tiġi reġistrata kull jum u pparagunata mal-valur tal-kontroll. Jekk ir-rata tal-mortalità tkun qed tiżdied bejn 24 s u 48 s filwaqt illi l-mortalità tal-kontrolli tibqa' f'livell aċċettabbli, i.e. < = 10 %, ikun xieraq illi l-prova tiġi estiża għal massimu ta' 96 s. Ir-riżultati jiġu analizzati sabiex jiġi kkalkulat l-LD_{50} fl-24 s u t-48 s u, fil-każ li l-istudju jiġi pprolongat, fit-72 s u fis-96 s.

▼B

1.4. VALIDITÀ TAL-PROVA

Sabiex prova tkun valida, japplikaw l-kondizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità medja għan-numru totali ta' kontrolli m'għandiex teċċedi 10 % fl-aħħar tal-prova,

— l-LD_{50} ta' l-istandard tossiku jilħaq il-firxa speċifikata.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-PROVA

1.5.1. **Kollezzjoni ta' naħal**

Jintużaw naħal ħaddiema żagħżagħ adulti ta' l-istess razza, i.e. naħal ta' l-istess età, mitmugħa bl-istess mod, eċċ. In-naħal għandu jinkiseb minn kolonji li għandhom reġina, li huma mitmugħin tajjeb, u sakemm dan ikun possibbli, li jkunu eżenti minn mard, bi storja u stat fiżjoloġiku magħruf. Jistgħu jiġu miġbura filgħodu l-jum tal-prova jew filgħaxija ta' qabel il-prova u miżmuma fil-kondizzjonijiet tal-prova sal-ġurnata ta' wara. Jistgħu jintużaw ukoll naħal miġbura minn għamliet bla duqqajs. Għandu jiġi evitat l-ġbir fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-ħarifa peress illi matul dan iż-żmien n-naħal ibiddel l-istat fiżjoloġiku tiegħu. Jekk il-provi ikollom jsiru fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-ħarifa, in-naħal jistgħu jitqegħdu f'inkubatur u mrobbija għal gimgħa b'"ħobż tan-naħal" (pollinu miġbur mix-xehdiet) u soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal li jiġi trattat b'sustanzi kimiċi, bħal m'huma antibiotiċi, prodotti antivarroa, eċċ., m'għandux jintuża għal provi ta' tossiċità qabel erba' ġimgħat mit-tmiem ta' l-aħħar trattament.

1.5.2. **Kondizzjonijiet ta' manteniment u alimentazzjoni**

Jintużaw gaġġeġ li jitnaddfu faċilment u li għandhom ventilazzjoni tajjba. Kull materjal xieraq jista' jintuża, e.ż. azzar stainless, xbieki tal-ħadid, plastik jew gaġġeġ ta' l-injam disposable, eċċ. In-numru idejali huwa ta' gruppi ta' għaxar naħliet f'kull gaġġa. Il-qies tal-gaġġeġ sperimentali għandu jkun xieraq għan numru ta' naħal, i.e. jipprovdi spazju adegwat.

In-naħal għandu jinżamm fid-dlam ġewwa kamra sperimentali f'temperatura ta' 25 ± 2 °C. L-umdità relattiva, normalment madwar 50-70 %, għandha tiġi reġistrata matul il-prova kollha. Proċeduri ta' manipolazzjoni, inklużi t-trattamenti u l-osservazzjonijiet jistgħu jsiru fid-dawl (naturali). L-alimentazzjoni tikkonsisti f'soluzzjoni ta' sukrosju fl-ilma b'konċentrazzjoni finali ta' 500 g/l (50 % w/v). Wara li jingħataw id-dożii sperimentali, l-alimentazzjoni għandha tingħata *ad libitum*. Is-sistema ta' alimentazzjoni għandha tħalli ssir reġistrazzjoni ta' kemm jiġi kkonsmat ikel f'kull gaġġa (ara taqsima 1.6.3.1). Tista' tintuża pipetta tal-ħġieġ (madwar 50 mm twila u 10 mm wiesgħa bin-naħa l-miftuħa li tidjieq għal djametru ta' madwar 2 mm).

1.5.3. **Preparazzjoni tan-naħal**

In-naħal miġbur jiġi allokat saltwarjament f'gaġġeġ sperimentali, li mbagħad jitpoġġew saltwarjament fil-kamra sperimentali.

▼B

Qabel ma tibda l-prova in-naħal jista' jitħalla bla ikel għal ħin massimu ta' 2 s. Huwa rakkomandat li n-naħal jitħalla bla ikel qabel it-trattament sabiex fil-bidu tal-prova in-naħal kollu jirriżulta ugwali f'termini tal-kontenut intestinali. Qabel ma tinbeda l-prova jeħtieġ illi jitneħħa n-naħal li jkun qiegħed imut u li jiġi sostitwit b'naħal b'saħħtu.

1.5.4. **Preparazzjoni tad-doża**

Meta s-sustanza sperimentali tkun waħda li tista' titħallat ma' ilma, din tista' titħallat direttament f'50 % soluzzjoni tas-sukrosju. Għal prodotti u sustanzi oħra tekniċi li ma jinħallux daqshekk malajr fl-ilma, jistgħu jintużaw vetturi oħra bħal solventi organiċi, emulsifiers jew dispersants li għandhom livell ta' tossiċità baxxa għan-naħal (e.ż. acetone, dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Il-konċentrazzjoni tal-vettura tiddependi fuq is- solubiltà tas-sustanza sperimentali li għandha tkun l-istess għal konċentrazzjonijiet kollha li ssirilhom il-prova. Madankollu, konċentrazzjoni tal-vettura ta' madwar 1 % hija ġeneralment xierqa u m'għandhiex tkun għola.

Sustanzi xierqa għall-kontroll għandhom jitlestew, i.e. meta solvent jew dispersant jintuza biex iħoll is-sustanza sperimentali, għandhom jintużaw żewġ gruppi ta': soluzzjoni fl-ilma, u soluzzjoni ta' sukrosju li jkollha s-solvent/trasportatur bil-konċentrazzjoni użata fis-soluzzjonijiet doża.

1.6. PROĊEDURA

1.6.1. **Gruppi sperimentali u gruppi għall-kontroll**

In-numru ta' doża u ta' repliċi ttestjati għandhom ikunu konformi mar-rekwiżiti statistiċi għad-determinazzjoni ta' l-LD_{50} mal-limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Normalment, għal-prova jeħtieġu ħames doża f'serie ġeometrika, b'fatturi li ma jaqbżux 2.2, u li jkopru l-firxa għall-LD_{50}. Madankollu, għandhom jiġu determinati l-fattur tat-taħlit ma' l-ilma u n-numru ta' konżentrazzjonijiet għad-doża b'relazzjoni ma' kemm tkun immejla l-kurva tat-tossiċità (doża kontra mortalità) u għandu jiġi ikkunsidrat il-metodu statistiku li ġie magħżul għall-analiżi tar-riżultati. Prova ta' riċerka fuq il-firxa tippermetti li jintgħażlu l-konċentrazzjonijiet appropjati għad-doża.

Minimu ta' tlett gruppi ta' provi repetuti, kull wieħed ta' tliet naħliet, għandu jiġi dożat b'kull konċentrazzjoni sperimentali. Oltre s-serje sperimentali hu neċessarju li jiġu analizzati minimu ta' tliet lottijiet ta' kontroll, kull waħda ta' 10 naħliet. Huma meħtieġa tliet gruppi ta' kontroll anke għal solventi/trasportaturi użati (ara taqsima 1.5.4).

1.6.2. **Sustanza tossika standard**

Fis-serje sperimentali għandha tiġi inkluża sustanza tossika standard. Jeħtieġ li jintgħażlu mill-anqas tlett doża li jkopru l-valur mistenni ta' LD_{50}. Għal kull doża sperimentali jintużaw mill-inqas tlett gaġġeġ repliċi, kull waħdha fiha għaxar naħliet. Is-sustanza tossika standard preferuta hija d-dimethoate, fejn l-LD_{50}-24 s orali rrapurtat huwa fil-firxa ta' 0,10- 0,35 μg s.a./naħla (2). Madankollu, huma ukoll aċċettabbli sustanżi tossiċi standard oħra jekk data suffiċenti tkun tista' tinġieb sabiex tiġi vverifikata r-risposta mistennija rigward id-doża(e.ż. parathion).

▼B

1.6.3. **Espożizzjoni**

1.6.3.1. *Somministrazzjoni tad-doża*

Kull grupp sperimentali ta' naħal għandu jirċievi 100-200 µl soluzzjoni tas-sukrosju ġo l-ilma ta' 50 %, li jkunu jinsabu fiha s-sustanza in eżami bil-konċentrazzjoni xierqa. Għal dawk il-prodotti li jdumu ma jinħallu fl-ilma, li għandhom livell ta' tossiċità baxx jew li għandhom livell ta' konċentrazzjoni baxx fil-formulazzjoni, huwa meħtieġ volum akbar peress illi jkunu jridu jintużaw proporzjonijiet għola fis-soluzzjoni tas-sukrosju. Il-monitoraġġ tal-kwantità ta' ikel trattat li jiġi ikkonsmat minn kull grupp hu neċessarju. Ġaladarba jittiekel (normalment f'3-4 s), il-kontenitur ta' l-ikel għandu jitneħħa minn ġol-gaġġa u mibdul b'kontenitur li jkun fih biss is-soluzzjoni tas-sukrosju. Is-soluzzjonijiet tas-sukrosju huma mbagħad provduti *ad libitum*. Għal xi sustanzi li jkollhom konċentrazzjoni elevata hu possibbli li n-naħal jirrifjuta l-ikel trattat. Wara ħin massimu ta' 6 s, l-ikel trattat li ma jiġix ikkonsmat għandu jinbidel b'soluzzjoni ta' sukrosju biss. Stima ta' l-ikel trattat ikkonsmat hija neċessarja (e.ż. kejl tal-volum/piż ta' l-ikel trattat li jkun fadal).

1.6.3.2. *Tul ta' żmien*

Preferibbilment, il-prova għandha ddum 48 s mill-mument meta s-soluzzjoni sperimentali tiġi sostitwita b'soluzzjoni ta' sukrosju biss. Jekk il-mortalità tkompli tgħola għal aktar minn 10 % wara l-ewwel 24 s, d-durata tal-prova għandha tiġi estiża għal massimu ta' 96 s sakemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

1.6.4. **Osservazzjonijiet**

L-mortalità tiġi reġistrata 4 s wara li tibda l-test u sussegwentement wara 24 s u wara 48 s (i.e. wara li tingħata d-doża). F'każ li l-perjodu ta' osservazzjoni jiġi pprolongat jeħtieġ li jkun hemm valutazzjonijiet oħra f'intervalli ta' 24 s sa ħin massimu ta' 96 s, CASemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

Għandu jkun hemm stima ta' l-ikel ikkonsmat minn kull grupp. Pargun bejn ir-rati ta' konsumazzjoni ta' ikel trattat u dak mhux trattat matul is-6 s imsemmija jista' jipprovdi informazzjoni dwar il-palatabiltà ta' l-ikel trattat.

Hu neċessarju li jiġu reġistrati l-anomaliji kollha fl-imġieba osservata matul il-prova.

1.6.5. **Prova limiti**

F'ċertu każijiet (e.ż. meta jkun mistenni illi sustanza sperimentali jkollha tossiċità baxxa) tista' ssir prova limiti bl-użu ta' 100µg s.a./naħla sabiex jintwera illi l-LD_{50} huwa akbar minn minn dan il-valur. L-istess proċedura għandha tintuża, inklużi t-tliet gruppi repliċi, għad-doża sperimentali, għall-kontrolli rilevanti, għall-istima ta' l-ammont ta' ikel ikkonsmat, u għall-użu ta' l-istandard tossiku. Jekk iseħħu każijiet ta' mortalità, irid isir studju komplet. Jekk jiġu osservati effetti subletali (ara taqsima 1.6.4), dawn għandhom jiġu reġistrati.

▼B

2. ***DATA* U RAPURTAĠĠ**

2.1. DATA

Id-*data* għandha tiddaħħal fil-qosor f'tabella li turi n-numru ta' naħal użat kif ukoll il-mortalità f'kull osservazzjoni u n-numru ta' naħal b'imġieba anomala għal kull grupp ta' trattament, ta' kontroll u relattiv għas-sustanza tossika standard. Sabiex tiġi analizzata d-*data* tal-mortalità jeħtieġ li jintużaw metodi statistiċi xierqa (e.ż. analiżi probit, medja mobbli, probbabiltà binomali) (3) (4). Jeħtieġ li jiġu mpinġija kurvi doża-tweġiba għal kull żmien ta' osservazzjoni rakkomandat u li tiġi kkalkolata l-mejla tal-kurvi u d-doži letali medji (LD_{50}) b'limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Il-korrezzjonijiet għall-mortalità bejn il-kontrolli jistgħu jiġu effettwati skond il-metodu ta' Abbott (4) (5). Meta l-ikel trattat ma jiġix ikkonsmat totalment, għandha tiġi determinata d-doża tas-sustanza sperimentali kkonsmata f'kull grupp. Il-LD_{50} għandha tiġi espressa f'ìg tas-sustanza sperimentali kull naħla.

2.2. RAPPORT TAL-PROVA

Ir-rapport tal-prova irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Sustanza sperimentali:**

— natura fiżika u propjetà fiżjokimika rilevanti (e.ż. stabilità fl-ilma, pressjoni tal-fwar),

— data kimika ta' identifikazzjoni, inkluża formula ta' struttura, purezza (i.e. għall-pestiżidi, l-identità u l-konċentrazzjoni ta' sustanza(/i) attiva(/i).

2.2.2. **Speċi sperimentali:**

— isem xjentifiku ta' l-ispeċi, razza, età approssimattiva (f'ġimgħat), metodu u data tal-ġabra,

— informazzjoni fuq kolonji użati għall-ġbir tan-naħal għall-isperimentazzjoni inkluż is-saħħa, eventwali mard ta' l-eżemplari adulti, eventwali pretrattamenti, eċċ.

2.2.3. **Kondizzjonijiet sperimentali:**

— temperatura u umdità relattiva tal-kamra sperimentali,

— kondizzjonijiet tal-housing inkluži t-tip, il-qies u l-materjal tal-gaġġa,

— metodi tal-preparazzjoni tar-riżerva u tas-sustanza sperimentali (meta jintuża, is-solvent u l-konċentrazzjoni tiegħu għandha tingħata), metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tar-riżerva u l-frekwenza tat-tiġdid (meta jintuża, l-aġent li jħoll u l-konċentrazzjoni tiegħu għandha tingħata),

— disinn sperimentali, e.ż. numru u konċentrazzjonijiet sperimentali użati, numru ta' kontrolli; għal kull konċentrazzjoni sperimentali u kontroll, numru ta' repliċi ta' gaġġeġ u numru numru ta' naħal f'kull gaġġa,

— data tal-prova.

▼B

2.2.4. **Riżultati:**

— riżultati ta' l-istudju preliminari tar-riċerka tal-firxa, jekk magħmul,

— *data* primarja: mortalità għal kull doża ttestjata f'kull ħin ta' osservazzjoni,

— grafika tal-kurvi doża-tweġiba fl-aħħar tal-prova,

— valuri ta' l-LD_{50} b'limiti ta' affidabilità with 95 %, għal kull ħin rakkomandat għall-osservazzjoni għas-sustanza tal-prova u għas-sustanza tossika standard,

— proċeduri statistiċi użati biex jistabilixxu l-LD_{50},

— mortalità bejn il-kontrolli,

— effetti oħra bioloġiċi osservati jew imkejla e.ż. mġieba anomala tan-naħal (inkluż ir-rifjut tad-doża sperimentali), rata tal-konsumazzjoni ta' l-ikel f'gruppi trattati u gruppi mhux trattati,

— devjazzjoni eventwali mill-proċedura tal-metodu sperimentali hawn deskritti u informazzjoni eventwali oħra rilevanti.

3. **REFERENZI**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. NAĦAL – PROVA TA' TOSSIĊITÀ AKUTA MILL-KUNTATT

1. METODU

Dan il-metodu ta' prova ta' tossiċità akuta huwa replika ta' l-OECD TG 214 (1998).

1.1. DAĦLA

Din il-prova ta' tossiċità huwa metodu li jntuża fil-laboratorju, magħmul biex issir stima tat-tossiċità mill-kuntatt akuta tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti u kimiċi oħra, lin-naħal adult li jkun qiegħed jaħdem.

Fl-istima u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' tas-sustanzi, d-determinazzjoni ta' tossiċità akuta mill-kuntatt fin-naħal tista' tukun meħtieġa, eż. meta jkun probabbli li n-naħal jiġi espost għal xi kimika. Din il-prova ta' tossiċità mill-kuntatt akuta jsir sabiex tiġi determinata it-tossiċità intrinsika ta' pestiċidi u kimiċi oħra għan-naħal. Ir-riżultati ta' din il-prova għandhom jintużaw biex jiġi definit il-bżonn għal evalwazzjoni ulterjuri. B'mod partikolari, dan il-metodu jista' jintuża f'programmi mqassma f'aktar minn fażi waħda sabiex jiġu determinati il-ħsarat tal-pestiċidi għan-naħal, ibbażat fuq sekwenza ta' provi ta' tossiċità ġol-laboratorju għal-esperimenti fuq is-semikamp u fuq il-kamp (1). Il-pestiċidi jistgħu jiġu ittestjati bħala sustanzi attivi (s.a.) jew bħala prodotti fformulati.

L-istandard tossiku għandu jiġi stabbilit sabiex tiġi vverifikata s-sensittività tan-naħal u l-preċiżjoni tal-prova proċedurali.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċità orali akuta: hija l-effett avvers li jseħħ f'perjodu massimu ta' 96 siegħa ta' applikazzjoni topika ta' dosa singola ta' sustanza sperimentali.

Doża: hija l-ammont tas-sustanza applikata. Id-doża hija espressa bħala l-massa (μg g) tas-sustanza sperimentali għal kull annimal sperimentali (μg/bee).

LD_{50} (doza letli medja) mill-kuntatt: hija doża singola ta' sustanza miġjuba statistikament li tista' tikkawża l-mewt f'50 % ta' l-annimali meta tiġi somministrata mill-kuntatt. Il-valur ta' l-LD_{50} huwa espress bħala μg) tas-sustanza sperimentali kull naħla. Fil- każ tal-pestiċidi, is-sustanza sperimentali tista' tkun kemm sustanza attiva (s.a.) kif ukoll prodott formulat li jkunu fih wieħed jew aktar sustanzi attivi.

Mortalità: annimal huwa registrat mejjet meta ikun kompletament immobbli.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-PROVA

Naħal ħaddiema adulti (*Apis mellifera*) huma esposti għal firxa ta' dożijiet tas-sustanza sperimentali maħlula f'trasportaturi xierqa, b'applikazzjoni diretta mas-sider (taqtir). Il-prova ddum 48 s. Jekk ir-rata tal-mortalità tkun qed tiżdied bejn 24 s u 48 s filwaqt illi l-mortalità tal-kontrolli tibqa' f'livell aċċettabbli, i.e. ≤ 10 %, ikun xieraq illi l-prova tiġi estiża għal massimu ta' 96 s. Il-mortalità għandha tiġi reġistrata kull jum u pparagunata mal-valur tal-kontroll. Ir-riżultati jiġu analizzati sabiex jiġi kkalkulat l-LD_{50} fl-24 s u t-48 s u, fil-każ li l-istudju jiġi pprolongat, fit-72 s u fis-96 s.

▼B

1.4. VALIDITÀ TAL-PROVA

Sabiex prova tkun valida, japplikaw l-kondizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità medja għan-numru totali ta' kontrolli m'għandux jeċċedi 10 % fl-aħħar tal-prova,

— l-LD_{50} ta' l-istandard tossiku jilħaq il-firxa speċifikata.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-PROVA

1.5.1. **Kollezzjoni ta' naħal**

Jintużaw naħal ħaddiema żgħażagħ adulti, i.e. naħal ta' l-istess età, mitmugħa bl-istess mod, ta' l-istess razza eċċ. In-naħal għandu jinkiseb minn kolonji li għandhom reġina, li huma mitmugħin tajjeb, u sakemm dan ikun possibbli, li jkunu eżenti minn mard, b'storja u stat fiżjoloġiku magħruf. Jistgħu jiġu miġbura filgħodu l-jum tal-prova jew filgħaxija ta' qabel il-prova u miżmuma fil-kondizzjonijiet tal-prova sal-ġurnata ta' wara. Jistgħu jintużaw ukoll naħal miġbura minn għamliet bla duqqajs. Għandhu jiġi evitat l-ġbir fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-ħarifa peress illi matul dan iż-żmien n-naħal ibiddel l-istat fiżjoloġiku tiegħu. Jekk il-provi jkollom jsiru fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-ħarifa, in-naħal jistgħu jitpoġġew f'inkubatur u mrobbija għal ġimgħa b' "ħobż tan-naħal" (pollinu miġbur mix-xehdiet) u soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal li jiġi trattat b'sustanzi kimiċi, bħal m'huma antibiotiċi, prodotti anti-varroa, eċċ., m'għandux jintuża għal provi ta' tossiċità qabel erba' ġimgħat mit-tmiem ta' l-aħħar trattament.

1.5.2. **Kondizzjonijiet ta' manteniment u alimentazzjoni**

Jintużaw gaġġeġ li jitnaddfu faċilment u li għandhom ventilazzjoni tajba. Kull materjal xieraq jista' jintuża, e.ż. azzar stainless, xbieki tal-ħadid, plastik jew gaġġeġ ta' l-injam disposable, eċċ. Il-qies tal-gaġġeġ sperimentali għandu jkun xieraq għan numru ta' naħal, i.e. jipprovdi spazju adegwat. In-numru idejali huwa ta' gruppi ta' għaxar naħliet f'kull gaġġa.

In-naħal għandu jinżamm fid-dlam ġewwa kamra sperimentali f'temperatura ta' 25 ± 2 °C. L-umdità relattiva, normalment madwar 50-70 %, għandha tiġi reġistrata matul il-prova kollha. Proċeduri ta' manipolazzjoni, inklużi t-trattamenti u l-osservazzjonijiet jistgħu jsiru fid-dawl (naturali). L-alimentazzjoni tikkonsisti f'soluzzjoni ta' sukrosju fl-ilma b'konċentrazzjoni finali ta' 500 g/l (50 % w/v) u għandha tingħata *ad libitum* matul iż-żmien tal-prova, permezz ta' kontenitur għall-ikel tan-naħal. Dan jista' jkun pipetta tal-ħġieġ (madwar 50 mm twila u 10 mm wiesgħa bin-naħa l-miftuħa li tidjieq għal djametru ta' madwar 2 mm).

1.5.3. **Preparazzjoni tan-naħal**

In-naħal miġbur jista' jiġi illoppjat b'carbon dioxide jew nitrogen għall-applikazzjoni tas-sustanza sperimentali. L-ammont ta' loppju użat u l-ħin ta' espożizzjoni għandu jiġi minimizzat. Qabel ma tinbeda l-prova jeħtieġ illi jitneħħa n-naħal li jkun qiegħed imut u li jiġi sostitwit minn naħal b'saħħithom.

1.5.4 **Preparazzjoni tad-doża**

Is-sustanza sperimentali għandha tiġi applikata bħalha soluzzjoni ġo trasportatur, i.e. solvent organiku jew soluzzjoni bl-ilma b'aġent li jxarrab, huwa preferibbli l-acetone imma jistgħu jintużaw ukoll solventi organiċi oħra li għandhom livell ta' tossiċità baxxa għan-naħal (e.ż. dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Għal dawk il-prodotti formulati mitlufa fl-ilma u s-sostanzi organiċi altament polari li ma jinħallux f'solventi organiċi jista' jirriżulta aktar faċli biex jiġu applikati jekk preparati f'soluzzjoni debboli ta' agent li jxarrab kummerċjali (e.ż. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Sustanzi xierqa għall-kontroll għandhom jitlestew, i.e. meta solvent jew dispersant jintuza biex iħoll is-sustanza sperimentali, għandhom jintużaw żewġ gruppi ta' gruppi ta' kontroll, wieħed trattat bl-ilma, u wieħed trattat b'is-solvent/id-dispersant.

1.6. PROĊEDURA

1.6.1. **Gruppi sperimentali u gruppi għall-kontroll**

In-numru ta' dożi u ta' repliċi ttestjati għandhom ikunu konformi mar-rekwiżiti statistiċi għad-determinazzjoni ta' l-LD_{50} mal-limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Normalment, għall-prova jeħtieġu ħames dożi f'serie ġeometrika, b'fatturi li ma jaqbżux 2.2, u li jkopru l-firxa għall-LD_{50}. Madankollu, għandhom jiġu determinati n-numru ta' dożi b'relazzjoni ma' kemm tkun immejla l-kurva tat-tossiċità (doża kontra mortalità) u għandu jiġi ikkunsidrat il-metodu statistiku li ġie magħżul għall-analiżi tar-riżultati. Prova ta' riċerka fuq il-firxa tippermetti li jintgħażlu d-dożi appropjati.

Minimu ta' tlett gruppi ta' provi repetuti, kull wieħed ta' tlett naħliet, għandu jiġi dożat b'kull konċentrazzjoni sperimentali.

Oltre s-serje sperimentali hu neċessarju li jiġu analizzati minimu ta' tlett lottijiet ta' kontroll, kull waħda ta' 10 naħliet. Jekk jintuża solvent organiku jew aġent li jxarrab tlett gruppi ta' kontroll addizzjonali ta' 10 naħliet kull wieħed iridu jiġu inklużi għas-solvent jew għall-aġent li jxarrab.

1.6.2. **Sustanza tossika standard**

Fis-serje sperimentali għandha tiġi inkluża sustanza tossika standard. Jeħtieġ li jintgħażlu mill-anqas tlett dożi li jkopru l-valur mistenni ta' LD_{50}. Għal kull doża sperimentali jintużaw mill-inqas tlett gaġġeġ repliċi, kull waħdha fiha 10 naħliet. Is-sustanza tossika standard preferuta hija d-dimethoate, fejn l- LD_{50} - 24 s mill-kuntatt rrapurtat huwa fil-firxa ta' 0,10 - 0,35 μg s.a./naħla (2). Madankollu, huma ukoll aċċettabbli sustanżi tossiċi standard oħra jekk data suffiċenti tkun tista' tinġieb sabiex tiġi vverifikata r-risposta mistennija rigward id-dożi(e.ż. parathion).

1.6.3. **Espożizzjoni**

1.6.3.1. *Somministrazzjoni tad-dożi*

Naħal illoppjat jiġi trattat individwalment permezz ta' applikazzjoni topika. In-naħal huwa assenjat saltwarjament għad-dożi sperimentali u kontrolli differenti. Permezz ta' mikroapplikatur għandu jiġi applikat volum ta' 1 μl tas-soluzzjoni li jkun fiha s-sustanza sperimentali bil-konċentrazzjoni xierqa fin-naħa tad-dahar tas-sider ta' kull naħla. Jekk ġustifikati, volumi oħra jistgħu jintużaw. Wara l-applikazzjoni, in-naħal jiġu allokati ġol-gaġġeġ sperimentali u mitmugħa b'soluzzjonijiet tas-sukrosju.

1.6.3.2. *Tul ta' żmien*

Preferibbilment, il-prova għandha ddum 48 s. Jekk il-mortalità tiżdied għal aktar minn 10 % bejn 24 s u 48h, d-durata tal-prova għandha tiġi estiża għal massimu ta' 96 s CASemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

▼B

1.6.4. **Osservazzjonijiet**

L-mortalità tiġi reġistrata 4 s wara l-applikazzjoni u sussegwentement wara 24 s u wara 48 s. F'każ li l-perjodu ta' osservazzjoni jiġi pprolongat jeħtieġ li jkun hemm valutazzjonijiet oħra f'intervalli ta' 24 s sa ħin massimu ta' 96 s, sakemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

Hu neċessarju li jiġu reġistrati l-anomaliji kollha ta' l-imġieba osservata matul il-prova.

1.6.5. **Prova limiti**

F'ċertu każijiet (e.ż. meta jkun pretiż illi sustanza sperimentali jkollha tossiċità baxxa) tista' ssir prova limiti bl-użu ta' 100 μg s.a./naħla sabiex jintwera illi l-LD_{50} huwa akbar minn minn dan il-valur. L-istess proċedura għandha tintuża, inklużi t-tlett gruppi repliċi, għad-doża sperimentali, għall-kontrolli rilevanti, u għall-użu ta' l-istandard tossiku.If mortalities occur, a full study should be conducted. Jekk jiġu osservati effetti subletali (ara taqsima 1.6.4), dawn għandhom jiġu reġistrati.

2. ***DATA*** **U RAPURTAĠĠ**

2.1. DATA

Id-data għandha tiġi mqassra ġo tabella li turi n-numru ta' naħal użat kif ukoll il-mortalità f'kull osservazzjoni u n-numru ta' naħal b'imġieba anomala għal kull grupp ta' trattament, ta' kontroll u relattiv għas-sustanza tossika standard. Sabiex tiġi analizzata d-*data* tal-mortalità jeħtieġ li jintużaw metodi statistiċi xierqa (e.ż. analiżi probit, medja mobbli, probbabiltà binomali) (3) (4). Il-kurvi għal *plot dose-response* f'kull ħin ta' osservazzjoni rakkomandat (i.e. 24 s, 48 s u, jekk inhu relevanti, 72 s, 96 s) u kkalkula l-kurvi u l-medja tad-doża letali (LD_{50}) b'95 % ta' limiti ta' kunfidenza. Il-korrezzjonijiet għall-mortalità bejn il-kontrolli jistgħu jiġu effetwati skond il-metodu ta' Abbott (4) (5). Il- LD_{50} għandha tiġi espressa f'ìg tas-sustanza sperimentali kull naħla.

2.2. RAPPORT TAL-PROVA

Ir-rapport tal-prova irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Sustanza sperimentali:**

— natura fiżika u propjetà fiżjo-kimika rilevanti (e.ż. stabilità fl-ilma, pressjoni tal-fwar),

— *data* kimika ta' identifikazzjoni, inkluża formula ta' struttura, purezza (i.e. għall-pestiżidi, l-identità u l-konċentrazzjoni ta' sustanza(/i) attiva(/i).

2.2.2. **Speċi sperimentali:**

— isem xjentifiku ta' l-ispeċi, razza, età approssimattiva (f'ġimgħat), metodu u data tal-ġabra,

— informazzjoni fuq kolonnji użati għall-ġbir tan-naħal għall-esperimentazzjoni inkluż is-saħħa, mard eventwali ta' l-eżemplari adulti, eventwali pretrattamenti, eċċ.

▼B

2.2.3. **Kondizzjonijiet sperimentali:**

— temperatura u umdità relattiva tal-kamra sperimentali,

— kondizzjonijiet tal-housing inkluži t-tip, il-qies u l-materjal tal-gaġġa,

— metodu ta' amministrazzjoni tas-sustanza sperimentali, e.ż. solvent trasportatur użat, volum tas-soluzzjoni sperimentali applikat, loppju użat,

— disinn sperimentali, e.ż. numru ta' dożi sperimentali użati, numru ta' kontrolli; għal kull doża sperimentali u kontroll, numru ta' repliċi ta' gaġġeġ u numru ta' naħal f'kull gaġġa,

— data tal-prova.

2.2.4. **Riżultati:**

— riżultati ta' l-istudju preliminari tar-riċerka tar-range, jekk magħmul,

— data primarja: mortalità għal kull doża ttestjata f'kull ħin ta' osservazzjoni,

— grafika tal-kurvi doża-tweġiba fl-aħħar tal-prova,

— valuri ta' l- LD_{50} b'limiti ta' affidabilità with 95 %, għal kull ħin rakkomandat għall-osservazzjoni għas-sustanza tal-prova u għas-sustanza tossika standard,

— proċeduri statistiċi użati biex jistabilixxu l- LD_{50},

— mortalità bejn il-kontrolli,

— effetti oħra bioloġiċi osservati jew imkejla e.ż. mġieba anomala tan-naħal,

— eventwali devjazzjoni mill-proċedura tal-metodu sperimentali hawn deskritti u eventwali informazzjoni oħra rilevanti.

3. **REFERENZI**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. **ADSORBIMENT/DESORBIMENT BL-UŻU TAL-METODU TA' L-EKWILIBRIJU TA' GRUPPI**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika ta' l-OECD TG 106, għad-Determinazzjoni ta' l-Assorbiment/Desorbiment tal-ħamrija, bl-użu ta' Metodu ta' Eqwilibriju ta' Gruppi (2000).

1.1. DAĦLA

Fl-elaborazzjoni tal-metodu preżenti, ingħata każ tar-riżultati ta' sperimentazzjoni ċirkolari u ta' workshop għall-għażla tal-ħamrija għall-iżvilupp ta' prova ta' l-adsorbiment (1) (2) (3) (4) kif ukoll linji gwida eżistenti fuq livell nazzjonali (5) (5) (6) (7) (8) (9) (10).

L-istudji fuq l-adsorbiment/desorbiment huma utli sabiex tinkiseb informazzjoni essenzali fuq il-mobilità tal-komposti kimiċi u d-distribuzzjoni tagħhom fil-ħamrija, fl-ilma u fl-arja tal-biosfera (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Din l-informazzjoni tista' tkun utli, pereżempju, sabiex wieħed ikun jista' jobsor jew jagħmel stima tad-disponibbiltà ta' prodott kimiku taħt aspetti varji: degredazzjoni (22) (23), trasformazzjoni u assimilazzjoni ta' l-organiżmi ħajjin (24); filtrazzjoni minn ġol-profil tal-ħamrija (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); volatilità mill-ħamrija (21) (29) (30); passaġġ mill-wiċċ ta' l-art għall-ilmijiet naturali (18) (31) (32). Id-data fuq l-adsorbiment tistà tintuża għall-skopijiet ta' paragunar u ta' mudellar (19) (33) (34) (35).

Id-distribuzzjoni ta' prodott kimiku bejn il-ħamrija u fażijiet li fihom l-ilma huwa proċess ikkomplikat li jiddependi fuq numru ta' fatturi differenti: in-natura kimika tas-sustanza (12) (36) (37) (38) (39) (40), il-karatteristiċi tal-ħamrija (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), u l-fatturi klimatiċi bħal ma huma l-inżul tax-xita, it-temperatura, id-dawl tax-xemx u r-riħ. Għaldaqstant, il-fenomeni numerużi u l-mekkaniżmi involuti fil-proċess ta' l-adsorbiment tal-ħamrija ta' sustanza kimika ma jistgħux jiġu definiti kompletament permezz ta' mudell simplifikat tal-laboratorju bħal m'hu il-metodu preżenti. Madankollu, anke jekk dan l-attentat ma jkunx jista' jkopri l-każijiet ambjentali kollha possibbli, jipprovdi informazzjoni ta' valur fuq ir-rilevanza ambjentali ta' l-adsorbiment ta' sustanza kimika.

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2. AMBITU

L-għan ta' dan il-metodu huwa li jivvaluta l-imġieba ta' l-adsorbiment/desorbiment ta' sustanza fuq il-ħamrija. L-għan huwa li jinkiseb valur ta' sorbiment li jkun jista' jintuża biex tinbasar partizzjoni taħt varjetà ta' kondizzjonijiet ambjentali; għal dan l-għan, għal kull prodott kimiku li jiġi meqjus, jiġu ddeterminati l-koeffiċjent ta' adsorbiment għall-ekwilibriju fuq tipi ta' ħamrija differenti bħala funzjoni tal-karatteristiċi tal-ħamrija stess (e.ż. kontenut karboniku organiku, kontenut ta' tafal u struttura tal-ħamrija u pH). Tipi differenti ta' ħamrija għandhom jintużaw sabiex ikopru bl-aktar mogħod wiesgħa possibbli l-interazzjonijiet ta' sustanza magħrufa ma' ħamrija li tiġri b'mod naturali.

F'dan il-metodu, l-adsorbiment jirrapreżenta l-proċess ta' vinkolazzjoni ta' sustanza kimika mal-wiċċ tal-ħamrija; ma tiddistingwix bejn proċessi differenti ta' adsorbiment (adsorbiment fiżiku u kimiku) u proċessi oħra bħad-degredazzjoni katalitika fil-wiċċ, l-adsorbiment bil-massa jew r-reazzjoni kimika. M'għandux jingħata każ ta' l-adsorbiment li jseħħ fuq il-partiċelli kolloidali (djametru < 0,2 μìm) ġenerati mill-ħamrija.

▼B

Il-parametri tal-ħamrija meqjusa l-aktar importanti għall-adsorbiment huma: kontenut karboniku organiku (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); kontenut ta' tafal u struttura tal-ħamrija (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) u pH għall-kompost ioniz-zabbli (3) (4) (42). Parametri oħra tal-ħamrija li jista' jkollhom impatt fuq l-adsorbiment/desorbiment ta' sustanza partikolari huma l-kapaċità effettiva ta' l-iskambju katjoniku (ECEC), il-kontenut ta' ossidi amorphous tal-ħadid u tal-aluminjum, partikolarment għal ħamrija volkanika u tropikali (4), kif ukoll il-wiċċ speċifiku (49).

Din il-prova hija magħmula biex tevalwa l-adsorbiment ta' prodotti kimiċi fuq tipi differenti ta' ħamrija differenti b'rage ta' kontenut karboniku organiku, kontenut ta' tafal u struttura tal-ħamrija, u pH li jvarja. Dan jikkonsisti f'tlett stadji:

Stadju 1: Studju preliminarju sabiex jiġi determinat:

— ir-rapport ħamrija/soluzzjoni,

— il-ħin ta' l-ekwilibriju għall-adsorbiment u l-ammont tas-sustanza sperimentali adsorbita f'l-ekwilibriju,

— l-adsorbiment tas-sustanza sperimentali fl-uċuħ tar-reċipjenti u l-istabilità tas-sustanza sperimentali matul il-perjodu sperimentali.

Stadju 2: Screening prova: l-adsorbiment huwa studjat f'ħames tipi differenti ta' ħamrija permezz ta' kinetika ta' adsorbiment ta' konċentrazzjoni singola u determinazzjoni tal-koeffiċjenti K_d u K_{oc}.

Stadju 3: Determinazzjoni ta' l-iżotermi ta' adsorbiment ta' Freundlich biex tiġi stabbilità l-influwenza tal-konċentrazzjoni fuq id-daqs ta' l-adsorbiment fuq il-ħamrija.

Studju tad-desorbiment permezz tal-kinetika ta' desorbi-ment/ta' l-iżotermi ta' adsorbiment ta' Freundlich (Anness 1).

1.3. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
A_{t_i}	persentaġġ ta' adsorbiment fil-ħin t_i	%
A_{eq}	persentaġġ ta' adsorbiment fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fil-ħin t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija matul l-intervall ta' ħin Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija f'l-equilibriju ta' l-adsorbiment	µg
m_0	massa tas-sustanza sperimentali fil-pipetta, fil-bidu tal-prova ta' l-adsorbiment	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali mkejla f'alikwota (v_a^A)fil-ħin t^i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa tas-sustanza fis-soluzzjoni f'l-ekwilibriju ta' l-assorbiment	µg
m_{soil}	kwantità tal-fażi ħamrija, espressa f'massa ta' ħamrija xotta	g

▼B

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
C_{st}	konċentrazzjoni ta' massa tas-soluzzjoni ta' riżerva tas-sustanza	μg cm^{-3}
C_0	konċentrazzjoni inizjali tal-massa tas-soluzzjoni sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija	μg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-fażi bl-ilma fil-ħin t_i, meta issir l-analiżi	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	kontenut tas-sustanza adsorbità fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	μg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-fażi bl-ilma fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	μg cm^{-3}
V_0	volum inizjali tal-fażi bl-ilma f'kuntatt ma' l- ilma matul il-prova ta' adsorbiment	cm^3
v_a^A	volum ta' l-alikwota fejn tiġi mkejla s-sustanza sperimentali	cm^3
K_d	koeffiċjent ta' distribuzzjoni għall-adsorbiment	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	koeffiċjent ta' adsorbiment normalizzat għall-karbonju organiku	cm^3 g^{-1}
K_{om}	koeffiċjent ta' distribuzzjoni normalizzat għas-sustanza organika	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	koeffiċjent ta' adsorbiment skond Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) 1/n g-1
1/n	esponenti ta' Freundlich	
D_{t_i}	persentaġġ ta' desorbiment fil-ħin t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	persentaġġ ta' desorbiment matul l-intervall ta' ħin Δt_i	%
K_{des}	koeffiċjenti apparenti ta' desorbiment	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	koeffiċjenti ta' desorbiment skond Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) 1/n g-1
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija fil-ħin t_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija matul l-intervall ta' ħin Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	Il-massa tas-sustanza determinata b'mod analitiku fil-fażi akwea f'ekwilibriju ta' *desorption*	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	Il-massa totali tas-sustanza għat-test li ġie *desorbed* f'ekwilibriju ta' *desorption*	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza li tibqa adsorbita fuq il-ħamrija wara l-intervall ta' ħin Δt_i	μg
m_{aq}^A	massa tas-sustanza residwa mill-ekwilibriju ta' adsorbiment minħabba sostituzzjoni mhux kompluta tal-volum	μg
$C_s^{des}(eq)$	kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa' adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment	μg g^{-1}

▼B

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
$C_{aq}^{des}(eq)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza sperimentali preżenti fil-faži bl-ilma fl-ekwilibriju tad-desorbiment	μg cm^{-3}
V_T	volum totali tal-faži bl-ilma b'kuntatt mal-ħamrija matul l-edperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment magħmul bil-metodu serje	cm^3
V_R	volum tas-supernatant mneħħi mil-pipetta wara li jintlaħaq ekwilibriju ta' adsorbiment u mibdul b'l-istess volum tas-soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volum ta' l-alikwota prelevata għal raġuni analitika mill-ħin (i), matul l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment magħmul bil-metodu serje	cm^3
$V_{ra}i^D$	volum tas-soluzzjoni prelevata mill-pipetta (i) biex titkejjel is-sustanza sperimentali, matul l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment (metodu paralleli)	cm^3
V_r^F	volum tas-soluzzjoni prelevata mill-pipetta biex titkejjel is-sustanza sperimentali, fl-ekwilibriju tad-desorbiment	cm^3
MB	bilanċ tal-massa	%
m_E	massa totali tas-sustanza sperimentali estratta f'żewġ stadji, mill-ħamrija u mill-ħitan tar-reċipjent	μg
V_{rec}	volum tas-supernatant miġbur wara li ntlaħaq l-fl-ekwilibriju tad-adsorbiment	cm^3
P_{ow}	koeffiċjent tar-ripartizzjoni octanol/ilma	
pKa	kostanti tad-disoċjazzjoni	
S_w	solubilità fl-ilma	g l^{-1}

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU SPERIMENTALI

Volumi magħrufa ta' soluzzjonijiet tas-sustanza sperimentali, mhux markata jew radjumarkata, b'konċentrazzjonijiet magħrufa 0,01 M $CaCl_2$ huma miżjuda ma' kampjuni ta' ħamrija ta' piż xott magħruf li kienu ekwilibrati qabel f'0,01 M $CaCl_2$ It-taħlita tiġi mħawwda għal żmien xieraq. Is-sospensjonijiet tal-ħamrija jiġu mbagħad separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u, jekk ikun mixtieq, filtrazzjoni u tiġi analizzata l-faži bl-ilma. L-ammont ta' sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija tiġi kkalkolata skond id-differenza bejn l-ammont ta' sustanza sperimentali preżenti fis-soluzzjoni mill-bidu u l-ammont li jibqa fl-aħħar ta' l-esperiment (metodu indirett).

Metodu ieħor biex tiġi determinata l-kwantità adsorbita tas-sustanza sperimentali huwa billi tiġi analizzata direttament il-ħamrija (metodu dirett). Din il-proċedura li teħtieġ estrazzjoni tal-ħamrija f'stadji suċċessivi permezz ta' solvent xieraq, hija rakkomandata f'każijiet fejn id-differenza fil-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tas-sustanza ma tistax tiġi determinata preċiżament. Eżempji ta' dawn il-każijiet huma: l-adsorbiment tas-sustanza sperimentali fil-wiċċ tar-reċipjenti fejn isir l-esperiment, instabilità tas-sustanza sperimentali matul il-ħin ta' l-esperiment, adsorbiment debboli li jagħti biss lok għal varjazzjonijiet żagħar ta' konċentrazzjoni fis-soluzzjoni; u adsorbiment qawwi li jwassal għal konċentrazzjonijiet baxxi li ma jistgħux jiġu determinati akkuratament. Jekk tintuża sustanza radjumarkata, l-estrazzjoni tal-ħamrija tista' tiġi evitata permezz ta' analiżi tal-faži ħamrija permezz tat-teknika tal-kombustjoni u l-għadd suċċessiv tax-xintillazzjoni fil-faži likwida. Madankollu, l-għadd tax-xintillazzjoni fil-faži likwida huwa metodu ta' teknika mhux speċifiku li ma jagħmilx distinzjoni bejn prodotti proġenituri u dawk ta' trasformazzjoni; għaldaqstant għandu jintuża biss jekk il-prodott kimiku sperimentali jibqa stabbli matul id-dewmien kollu ta' l-istudju.

▼B

1.5. INFORMAZZJONI FUQ IS-SUSTANZA SPERIMENTALI

Ir-reattivi kimiċi għandhom ikunu ta' livell analitiku. Huwa rakkomandat l-użu ta' sustanzi li ma jkunux immarkati b'komposizzjoni magħrufa u preferibbilment purezza mhux anqas minn 95 % jew ta' sustanzi sperimentali radjumarkati li għandhom komposizzjoni u radjupurezza magħrufa. Fil-każ ta' radjumarkaturi ta' nofs-ħajja qasira, għandhom jiġu applikati korrezzjonijiet adegwati.

Qabel ma ssir prova għall-adsorbiment-desorbiment, l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza sperimentali għandha tkun disponibbli:

(a) solubilità fl-ilma (A.6);

(b) tensjoni tal-fwar (A.4) u/jew il-Kostanti tal-Liġi ta' Henry;

(ċ) degradazzjoni antibjotika: idrolisi bħalha funzjoni tal-pH (C.7);

(d) koeffiċjent tar-ripartizzjoni (A.8);

(e) bijodegrabilità ta' malajr (C.4) jew trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-ħamrija;

(f) pKa tas-sustanzi ionizzabili;

(g) fotoliżi diretta fl-ilma (i.e. spectrum ta' adsorbiment UV-Vis fl-ilma, rendiment quantum) u fotodegradazzjoni fil-ħamrija.

1.6. APPLIKABBILITÀ TAL-PROVA

Din il-prova hi applikabbli għas-sustanzi kimiċi għal-liema jista' jiġi applikat metodu analitiku suffiċjentement akkurat. L-istabbilità tas-sustanza sperimentali matul il-ħin neċessarju biex titwettaq il-prova huwa parametru importanti li jista' jinfluwenza l-affidabilità tar-riżultati, speċjalment meta jiġi applikat il-metodu indirett. Għaldaqstant, huwa neċessarju li din l-istabbilità tiġi verifikata tramiti studju preliminari; jekk tiġi osservata trasformazzjoni fil-perjodu ta' ħin tal-prova, huwa rakkomandat li l-istudju prinċipali għandu jiġi eżegwit billi jiġu analizzati kemm il-fażi ħamrija kif ukoll il-fażi ta' l-ilma.

Jistgħu jinħolqu diffikultajiet meta din il-prova isir għal sustanzi li għandhom solubilità baxxa fl-ilma ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), kif ukoll għal sustanzi ta' karika elevata, dovut għall-fatt illi l-konċentrazzjoni fil-fażi bl-ilma ma tistax tiġi mkejla analitikament b'akkuratezza effiċjenti. F'dawn il-każijiet, iridu jittieħdu passi addizzjonali. Il-mod kif wieħed jista' jaffronta dawn il-problemi jista' jinstab fit-taqsima relevanti ta' dan il-metodu.

Fl-isperimentazzjoni fuq sustanzi li jiżvintaw, għandhom jittieħdu prekawzjonijiet biex telf matul l-istudju jiġi evitat.

1.7. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.7.1. **Apparat u reattivi kimiċi**

Apparat normali tal-laboratorju, speċjalment li ġej:

(a) Pipetti jew kontenituri biex isir l-esperiment. Huwa importanti li dawn il-pipetti jew kontenituri:

— joqgħodu direttament fiċ-ċentrifuga sabiex jiġi miniminizzat telf fil- manipolazzjoni u trasferiment,

— jkunu magħmula minn materjal inert, li jimminimizza l-adsorbiment fil-wiċċ tas-sustanza sperimentali.

▼B

(b) Apparat għat-taħwid: overhead shaker jew apparat ekwvilenti; l-apparat għat-taħwid għandu jżomm il-ħamrija sospiża matul it-taħwid.

(ċ) Ċentrifuga: preferibbilment ta' veloċità għolja, e.ż. forza ċentrifuga > 3 000 g, temperatur kontrollata, kapaċi tneħħi partiċelli b'djametru akbar minn 0,2 μm minn soluzzjonijiet bl-ilma. Sabiex jiġi evitat telf dovut għal volatilità jew ta' ilma, dawn il-kontenituri għandhom jinżammu mgħottija matul iċ-ċentrifugazzjoni u t-taħwid; biex jiġi minimizzat l-adsorbiment fuq l-għotjien, dawn iridu jiġu diżattivati pereżempju għotjin mgħottija bit-teflon.

(d) Fakultattiv: apparat għall-filtrazzjoni; filtri ta' porożità ta' 0,2 μm, sterili, għal użu wieħed. Kura speċjali għandha tingħata għall-għażla tal-materjal għall-filtrazzjoni sbiex telf eventwali tas-sustanza sperimentali minn dan il-materjal jiġi evitat; għal dawk is-sustanzi li ma jinħallux malajr, mhux opportun li jintuża materjal għall-filtrazzjoni organiku.

(e) Strumentazzjoni analitika, adatta biex titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika sperimentali.

(f) Forn tal-laboratorju, kapaċi jżomm temperatura ta' 103 °C sa 110 °C.

1.7.2. **Karatterizzazzjoni u selezzjoni tal-ħamrija**

Il-ħamrija għandha tiġi karatterizzata minn tlett parametri li huma meqjusa maġġorment responsabbli għall-kapaċitaà ta' l-adsorbiment: karbonju organiku, kontenut f'tafal u struttura tal-ħamrija, u pH. Kif diġà msemmi (ara Skop) għandhom jiġu meqjusa propjetajiet fiżiko-kimiċi oħra tal-ħamrija li jista' jkollhom impatt fuq l-adsorbiment/desorbiment ta' sustanza partikolari.

Il-metodi użati għall-karatterizzazzjoni tal-ħamrija huma importanti ħafna u jistà jkollhom influwenza sinifikattiva fuq ir-riżultati. Għaldaqstant, huwa rakkomandat illi l-pH tal-ħamrija għandha titkejjel f'soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$ (iġifieri fis-soluzzjoni użata għall-prova ta' l-adsorbiment/desorbiment) skond il-metodu ISO li jikkorrispondi (ISO-10390-1). Huwa rakkomandat ukoll illi jiġu determinati l-popjetajiet rilevanti l-oħra tal-ħamrija skond metodi standard (pereżempju ISO 'Manwal ta' l-Analiżi tal-Ħamrija'); dan jippermetti illi l-analiżi tad-data fuq is-sorbiment tkun ibbażata fuq parametri tal-ħamrija standardizzati globalment. Ir-refernzi (50-52) jagħtu xi indikazzjonijiet fuq il-metodi standard disponibbli għall-analiżi u għall-karatterizzazzjoni tal-ħamrija. Għall-kalibrazzjoni tal-metodi sperimentali tal-ħamrija, huwa rakkomandat l-użu ta' ħamrija ta' referenza.

It-Tabella 1 tagħti indikazzjoni għall-għażla tal-ħamrija għall-esperimenti ta' l-adsorbiment/desorbiment. Is-seba' kwalitajiet ta' ħamrija magħżula ikopru l-kwalitajiet li jinstabu f'żoni ġeografiċi temperati. Meta s-sustanzi sperimentali ikunu ionizzabbli, il-kwalitajiet ta' ħamrija magħżula għandhom ikopru range wiesgħa ta' pH, sabiex ikun jista' jiġi evalwat l-adsorbiment tas-sustanza fil-forma ionizzata u dik mhux ionizzata. Indikazzjoni fuq kemm il-kwalità ta' ħamrija għandha tintuża fl-istadji varji tal-prova tinstab taħt 1.9. Eżekuzzjoni tal-prova.

Jekk jiġu preferuti kwalitajiet oħra ta' ħamrija, għandhom jiġu karatterizzati permezz ta' l-istess parametri u għandu jkollhom varjazzjoni simili fil-propjetajiet għal dawk deskritti f'Tabella 1, anke jekk ma jaqblux eżattament mal-kriterji.

▼B

Tabella 1:

Gwida għas-selezzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija għall-adsorbiment-desorbiment

Kwalità ta' ħamrija	Range ta' pH (f'0,01 M $CaCl_2$)	Kontenut f'karbonju organiku (%)	Kontenut f'tafal (%)	Komposizzjoni tal-ħamrija (*)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 – 80	tafal
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 – 40	art taflija
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 – 25	art imtajjna
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 – 30	art tajba u għammiela
5	< 4,0 - 6,0	< 0,5 - 1,5	< 10 – 15	art imrammla
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0	40 – 65	art taflija/tafal
7	< 4,5	> 10	< 10	ramel/art imrammla

([1]) Skond il-FAO u s-sistema US (85).
([2]) Il-varjabbli rispettivi għandhom juru preferebbilment il-valuri fil-medda mogħtija. Jekk, madankollu, ikun hemm diffikultajiet fis-sejba tal-materjal ta' ħamrija xieraq, il-valuri taħt il-minimu indikat huma aċċettati.
([3]) Il-ħamrija b'inqas minn 0,3 % tal-karbonju organiku tista' tfixkel il-korrelazzjoni bejn il-kontenut organiku u ta' adsorbiment. Għalhekk, huwa rakkomandat l-użu tal-ħamrija li fiha kontenut minimu ta' karbonju organiku ta' 0,3 %.

1.7.3. **Kollezzjoni u ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija**

1.7.3.1. *Kollezzjoni*

Għall-kampjunaġġ mhumiex rakkomandati tekniċi jew strumenti speċifiċi; it-teknika tal-kampjunaġġ tiddependi fuq il-finalità ta' l-istudju (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Għandu jitqies dan li ġej:

(a) informazzjoni dettaljata fuq l-istorja ta' l-għalqa minn fejn sar il-kampjunaġġ hija neċessarja; dan jinkludi l-lokalità, il-medda vegetali, trattamenti bl-użu ta' pestiċidi u/jew fertilizzanti, żidiet bioloġiċi jew kontaminazzjoni aċċidentali. Rigward id-deskrizzjoni tal-lokalità fejn sar il-kampjunaġġ, għandhom jiġu osservati r-rakkomandazzjonijiet ta' l-standard ta' l-ISO fuq il-kampjunaġġ tal-ħamrija (ISO 10381-6);

(b) il-lokalità fejn sar il-kampjunaġġ trid tiġi definita skond il-metodu UTM (Proġettazzjoni Universali Trażversali Merkatorja/Datum Orizzontali Ewropew) jew permezz tal-koordinati ġeografiċi tiegħu; dan jista' jippermetti rikollizzjoni ta' kwalità ta' ħamrija partikolari fil-futur jew jist' jgħin jiddefinixxi l-ħamrija taħt sistemi varji ta' klassifikazzjoni użati f'pajjiżi differenti. Ukoll, jinġabar biss l'orizzont A sa fond massimu ta' 20 ċm. Speċjalment għal-kwalità ta' ħamrija n. 7 jekk il-ħamrija tagħmel parti minn orizzont O_h, dan irid jiġi miżjud fril-kampjunaġġ.

Il-kampjuni tal-ħamrija għandhom jinġarrew permezz ta' kontenituri u taħt u f'kondizzjonijiet ta' temperatura li jiggarantixxu li l-propjetajiet oriġinali tal-ħamrija ma jiġux mibdula b'mod sinifikattiv.

▼B

1.7.3.2. *Ħażna*

L-użu ta' ħamrija prelevata reċentement huwa preferibbli. Biss meta dan ma jkunx possibbli l-ħamrija tista' tiġi maħżuna f'temperatura ambjentali u għandha tinżamm niexfa bl-arja. Għall-ħażna mhux rakkomandat l-ebda limitu ta' ħin partikolari, imma ħamrija maħżuna għal aktar minn tliet snin għandha tiġi rianalizzata qabel l-użu biex jiġi verifikat il-kontenut karboniku organiku, pH u CEC.

1.7.3.3. *Manipolazzjoni u preparazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija għall-prova*

Il-ħamrija trid tiġi mnixxfa bl-arja f'temperatura ambjentali (preferibbilment bejn 20-25 °C). Is-disgregazzjoni trid tiġi magħmula bl-anqas forza possibbli, sabiex l-istruttura oriġinali tal-ħamrija tinbidel mill-anqas possibbli. Il-ħamrija trid tintgħarbel sa qies partikolari ≤ 2 mm; skond ir-rakkomandazzjonijiet tan-norma ta' l-ISO fuq il-kampjunaġġ tal-ħamrija (ISO 10381-6). Homogenità akkurata hija rakkomandata, peress li din tkabbar ir-reproċibilità tar-riżultati. Il-kontenut ta' umdità f'kull kwalità ta' ħamrija hu determinat fuq tlett aliquoti msaħħna sa 105 °C CASemm ma jkun hemm l-ebda tibdil sinifikattiv fil-piż (approssimament 12 s). Għall-kalkoli kollha il-massa tal-ħamrija tirreferi għall-massa xxottata fil-forn, i.e. il-piż tal-ħamrija kkoreġut għall-kontenut ta' umdità tiegħu.

1.7.4. **Preparazzjoni tas-sustanza sperimentali għall-applikazzjoni għall-ħamrija**

Is-sustanza sperimentali tiġi maħlula f'soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ f'ilma distillat jew deionizzat; is-soluzzjoni ta' $CaCl_2$, użata bħala l-faża tas-solvent bl-ilma, tiswa biex titjieb iċ-ċentrifugabilità u timminimizza l-iskambjar ta' katjoniku. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna preferibbilment għandha tkun tlett ordini ta' kobor għola mil-limitu tas-sejba tal-metodu analitiku użat. Dan il-parametru jissalvagwardja miżuri akkurati fil- każ tal-metodoloġija użata f'dan il-metodu; barra minn hekk, il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna għandha tkun inferjuri għas-solubilità tas-sustanza sperimentali fl-ilma.

Preferibbilment, is-soluzzjoni maħżuna għandha titlesta' immedjatament qabel il-ħin ta' l-applikazzjoni għall-kampjuini tal-ħamrija u għandha tinżamm magħluqa fid-dlam f'4 °C. Il-ħin tal-ħażna jiddependi fuq l-istabbilità tas-sustanza sperimentali u l-konċentrazzjoni tagħha fis-soluzzjoni.

Sustanzi lijdumu biex jinħallu biss ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), jista' jkun neċessarju aġent xieraq għas-solubilizazzjoni meta diffiċilment tinħall is-sustanza sperimentali. Dan l-aġent għas-solubilizazzjoni: (a) irid ikun jitħallat ma l-ilma bħal methanol jew acetonitrile; (b) il-konċentrazzjoni tiegħu ma tridx taqbeż 1 % tal-volum totali tas-soluzzjoni maħżuna u trid tikkostitwixxi anqas minn dan fis-soluzzjoni tas-sustanza sperimentali li tiġi f'kuntatt mal-ħamrija (preferibilment anqas minn 0,1 %); u (ċ) m'għandux ikun surfactant jew jagħti lok għal reazzjonijiet solvolitiċi mas-sustanza kimika sperimentali. L-użu ta' aġent solubilizzani għandu jiġi msemmi u ġustifikat fir-rapurtaġġ tad-data.

Alternattiva oħra għal sustanzi li jinħallu bil-mod tikkonsisti fiż-żieda intenzjonali tas-sustanza sperimentali mas-sistema sperimentali: is-sustanza sperimentali tiġi maħlula ġo solvent organiku, u minn dan alikwota tiġi miżjuda mas-sistema tal-ħamrija u 0,01 M soluzzjoni ta' $CaCl_2$ f'ilma distillat jew deionizzat. Il-kontenut tas-solvent organiku fil-faża bl-ilma għandha tinżamm l-aktar baxxa possibbli, normalment li ma taqbiżx 0,1 %. Iż-żieda intenzjonali ta' soluzzjoni organika tista' tikkomprometti r-riproduċibilità mill-aspett tal-volum. Għaldaqstant, żball addizzjonali jista' jiġi introdott bħala s-sustanza sperimentali u konċentrazzjoni tal-kosolvent ma jkunx l-istess fil-provi kollha.

▼B

1.8. PREREQUIŻITI GĦALL-EŻEKUZZJONI TAL-PROVA TA' L-ADSORBIMENT/DESORBIMENT

1.8.1. **Metodu analitiku**

Fost il-paramentri ewlenin li jistgħu jinfluwenzaw l-akkuratezza tal-miżuri tas-sorbiment hemm il-preċiżjoni tal-metodu analitiku fl-analiżi kemm tal-faži soluzzjoni, kif ukoll tal-faži ta' l-adsorbiment, l-istabilità u l-purezza tas-sustanza sperimentali, il-kisba ta' l-ekwilibriju tas-sorbiment, l-ordni tal-kobor tal-varjazzjonijiet ta' konċentrazzjoni tas-soluzzjoni, ir-rapport ħamrija/soluzzjoni u il-varjazzjonijiet fl-istruttura tal-ħamrija matul il-proċess ta' ekwilibrazzjoni (35) (59-62). Xi eżempji, fokalizzati fuq il-preċiżjoni, jinstgħabu fl-Anness 2.

L-attendibilità tal-metodu analitiku li jintuża trid tiġi kontrollata fir-range ta' konċentrazzjoni li x'aktarx iseħħ matul il-prova. Min jagħmel l-esperiment għandu jħossu ħieles li jiżviluppa metodu xieraq b'akkuratezza, preċiżjoni, riproduċibilità, limiti ta' rivelazzjoni u ġbir xierq. Gwida għall-eżekuzzjoni tal-prova hija mogħtija fl-esperiment li ġej.

Volum xieraq ta' 0,01 M $CaCl_2$, e.ż. 100 $ċm_3$, jitħawwad għal 4 s bil-piż ta' ħamrija, e.ż. 20 g, li għandha adsorbiment għoli, i.e. b'kontenut għoli ta' karbonju organiku u ta' tafal; dawn il-piżijiet u volumi jistgħu ivarjaw skond bżonnijiet analitiċi, imma rapport ħamrija/soluzzjoni ta' 1:5 jista' jirrapreżenta punt ta' bidu konvenjenti. It-taħlita tiġi ċentrifugata u l-faži bl-ilma tista' tiġi filtrata. Ma' din ta' l-aħħar jiġi miżjud volum determinat ta' soluzzjoni maħżuna tas-sustanza sperimentali sabiex kiseb konċentrazzjoni nominali fil-kamp tar-range ta' konċentrazzjoni li x'aktarx iseħħ matul il-prova. Dan il-volum m'għandux jaqbeż 10 % tal-volum finali tal-faži bl-ilma, sabiex in-natura tas-soluzzjoni ta' preekwilibrazzjoni tinbidel mill-anqas possibbli. Is-soluzzjoni tiġi analizzata.

Sabiex jitqiesu s-sustanzi artifiċjali użati fil-mod analitiku u l-effetti martiċi kkawżati mill-ħamrija irid jiġi inkluż "blank run" li jikkonsisti f'sistema ta' ħamrija + soluzzjoni ta' CaCl2 (mingħajr iż-żieda tas-sustanza sperimentali).

Għall-miżuri ta' sorbiment jistgħu jintużaw metodi analitiċi, fosthom kromatografija gass-likwidu (GLC), kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja (HPLC), spettrometrija (e.ż. GC/spettrometrija tal-massa, HPLC/spettrometrija tal-massa) u kont tax-xintillazzjonijiet likwidi (għall-sustanzi radjumarkati). Indipendentement mill-metodu analitiku użat, huwa meqjus adegwat jekk il-ġbir ikun bejn 90 % u 110 % tal-valur nominali. Sabiex titħalla l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni wara li ssir r-ripartizzjoni, il-limiti tar-rivelazzjoni tal-metodu analitiku trid tkun ta' l-anqas żewġ ordinjiet ta' kobor anqas mill-konċentrazzjoni nominali.

Il-karatteristiċi u limiti ta' rivelazzjoni tal-metodu analitiku utilizzat biex isiru l-istudji fuq l-adsorbiment huma importanti biex jiġu definiti il-kondizzjonijiet sperimentali u l-eżekuzzjoni sħiħa tal-prova. Dan il-metodu jsegwi skema sperimentali ġenerali u jipprovdi rakkomandazzjonijiet u linji gwida għal soluzzjonijiet alternattivi fejn il-metodu analitiku u l-faċilitajiet tal-laboratorju jimponi limitazzjonijiet.

▼B

1.8.2. **Għażla tar-rapporti ottimali ħamrija/soluzzjoni**

Fl-istudji tal-fenomeni fuq is-sorbiment, l-għażla tar-rapporti ħamrija/soluzzjoni tiddependi mill-koeffiċjent tad-distribuzzjoni K_d u mill-grad relattiv ta' adsorbiment mixtieq. Il-varjazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjoni tiddetermina l-preċiżjoni statistika tal-miżura li tiddependi mill-forma ta' l-ekwazzjoni ta' l-adsorbiment u, fil-każ ta' l-iskoperta tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimikafis-soluzzjoni, tal-limitazzjoni tal-metodoloġija analitika applikata. Għaldaqstant, fil-prattika ġenerali, ikun utli li jiġu adottati numru limitat ta' rapporti fissi, fejn il-perċentwali ta' adsorbiment tkun aktar minn 20 %, u preferibbilment > 50 % (62), fl-istess ħin kura trid tingħata sabiex il-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fil-fażi bl-ilma tkun dejjem għolja biżżejjed li tiġi mkejla bi preċiżjoni. Dan huwa partikolarment importanti meta il-perċentwali ta' adsorbiment ikunu għolja.

Approċċ konvenjenti biex jintgħażlu r-rapporti ħamrija/ilma xierqa, jibbaża fuq stima tal-valur K_d permezz ta' studji preliminarji jew permezz ta' metodi ta' teknika ta' valutazzjoni stabbiliti (Anness 3). Ir-rapport xieraq jista' mbagħad jintgħażel fuq il-bażi ta' grafika tar-rapport ħamrija/soluzzjoni versus Kd għal persentaġġi fissi ta' adsorbiment (Fig. 1). Tali grafika hija bbażata fuq il-preżuppost li l-ekwazzjoni ta' l-assorbiment hija lineari ([1]). Ir-ralazzjoni applikabbli tinkiseb billi titranġa l-ekwazzjoni (4) tal-K_d fil-forma ta' ekwazzjoni

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

jew fil-forma logaritmika tagħha, billi tassumi li $R = m_{soil}/V0$ and $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{eq}\%/100}{1 - A_{eq}\%/100}\right] \qquad (2)$$

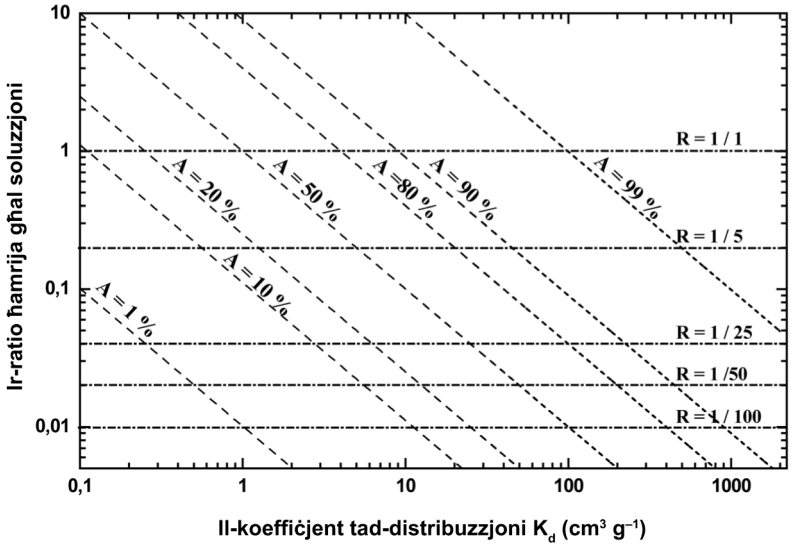


Fig. 1. Relazzjoni bejn il-valur ta' K_d u r-rapporti varji ħamrija/soluzzjoni fil-perċentwali varji tas-sustanza sperimentali adsorbita

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

Fig. 1 turi rapporti ħamrija/soluzzjoni meħtieġa bħalha funzjoni K_d għal-livelli differenti ta' adsorbiment. Pe reżempju, għal rapport ħamrija/soluzzjoni ta' 1:5 u K_d ta' 20, l-adsorbiment għandu jkun ta' madwar 80 %. Biex jinkiseb 50 % adsorbiment għall-istess ammont ta' K_d, irid jintuża rapport ta' 1:25. Dan l-approċċ, biex jintagħżlu rapporti xierqa ħamrija/soluzzjoni, joffri lill-investigatur il-flessibilità neċessarja biex ilaħħaq ma' l-eżiġenzi sperimentali.

L-akbar diffikultajiet huma dawk fejn is-sustanza kimika tiġi adsorbita b'doża għolja ħafna jew baxxa ħafna. Meta jkun hemm adsorbiment baxx, hu rakkomandabbli l-użu ta' rapport ħamrija/soluzzjoni ta' 1:1, għalkemm għal xi tipi ta' ħamrija ta' kontenut organiku għoli jistgħu jkunu neċessarji miżuri iżar sabiex tinkiseb taħlita likwida. Fil-metodoloġija analitika kura trid tingħata biex jitkejjlu bidliet żgħar fil-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni; inkella l-kejl ta' l-adsorbiment ma jkunx preċiż. Minn naħa l-oħra, għal valuri għolja ħafna ta' Kd, tista' tasal għal rapporti ħamrija/soluzzjoni ta' 1:100 biex tħalli fis-soluzzjoni kwantità sinifikattiva ta' sustanza kimika. Madankollu, kura trid tingħata sabiex taħlit sew jiġi żgurat, ħin adegwat irid jitħalla biex is-sistema tilħaq ekwilibriju. Biex issolvi dawn il-każijiet estremi meta metodoloġija analitika tkun nieqsa, possibiltà oħra hija dik li tipprevedi l-valur ta' K_d bl-użu ta' tekniċi ta' valutazzjoni bbażati, pereżempju, fuq valuri P_{ow} (Anness 3). Dan jista' jkun utli speċjalment għal sustanzi kimiċi li għandhom adsorbiment baxx/polari b' $P_{ow} < 20$ u għal dawk lipofili/altament sorbitivi b' $P_{ow} > 10^4$.

1.9. EŻEKUZZJONI TAL-PROVA

1.9.1. Il-kondizzjonijiet tal-prova

L-esperimenti kollha iridu jsiru f'temperatura ambjentali u, jekk possibbli, f'temperatura kostanti bejn 20 °C u 25 °C.

Il-kondizzjonijiet għaċ-centrifugazzjoni iridu jippermettu t-tneħħija ta' partiċelli akbar minn 0,2 μm mis-soluzzjoni. Dan il-valur huwa l-iżar partiċella li hija kkunsidrata partiċella solida, u jirrapreżenta l-limitu bejn partiċelli solidi u kolloidali. Gwida biex jiġu stabbiliti l-kondizzjonijiet taċ-ċentrifugazzjoni hija mogħtija fl-Anness 4.

Jekk il-faċilitajiet taċ-ċentrifugazzjoni ma jkunux jistgħu jiggarantixxu t-tneħħija ta' partiċelli akbar minn 0,2 μm, kombinazzjoni ta' ċentrifugazzjoni u filtrazzjoni b'filtri 0,2 μm tista' tintuża. Dawn il-filtri għandhom ikunu magħmula minn materjal inert xieraq biex jinevita telf tas-sustanza sperimentali fuqhom. F'kull każ, għandu jiġi ppruvat li ma jkun hemm l-ebda telf tas-sustanza sperimentali matul il-filtrazzjoni.

1.9.2. **Stadju 1 – Studju preliminarju**

L-iskop ta' studju preliminarju diġà ngħata fis-sezzjoni Skop. Gwida biex issir tali prova hija mogħtija fl-esperiment suġġerit hawn taħt.

1.9.2.1. *Selezzjoni tar-rapporti ottimali ħamrija/soluzzjoni*

Jintużaw żewġ tipi ta' ħamrija u tlett rapporti ħamrija/soluzzjoni (sitt esperimenti). Tip ta' ħamrija għandha kontenut għoli ta' karbonju organiku u kontenut baxx ta' tafal, u l-oħra għandha kontenut baxx ta' karbonju organiku u kontenut għoli ta' tafal. Ir-rapporti ħamrija/soluzzjoni huma suġġeriti:

— 50 g ħamrija u 50 $ċm^3$ soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/1),

▼B

— 10 g ħamrija 50 ċm^3 soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/5),

— 2 g ħamrija u 50 ċm^3 soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/25).

L-ammont minimu ta' ħamrija li għandha tintuża tiddependi mill-faċilitajiet tal-laboratorju u l-eżekuzzjoni tal-metodi analitiċi użati. Madankollu, biex jinkisbu riżultati affidabbli mill-prova, hu rakkomandat illi tintuża mill-anqas 1 g, u preferibbilment 2 g.

Sabiex tiġi verifikata l-istabbilità tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni ta' $CaCl_2$ u l-adsorbiment eventwali fuq il-ħitan tal-kontenituri, irid jitlesta' kampjun ta' riferiment li ma jkunx fih ħamrija imma jkun fih biss is-sustanza sperimentali f'soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$ li jiġi sottopost eżattament għall-istess passi tas-sistemi sperimentali.

Għal kull ħamrija jiġi preparat "blank run" bl-istess ammont ta' ħamrija u volum totali ta' soluzzjoni 50 ċm^3 0,01 M $CaCl_2$ (mingħajr prova sperimentali) li tiġi sottoposta għall-istess proċedura sperimentali. Dan iservi bħala kontroll bażiku matul l-analiżi biex jiġu skoperti sustanzi li jinterfeixxu jew ħamrija kontaminata.

L-esperimenti kollha, inklużi kontrolli u "blanks", għandhom isiru minn l-anqas darbtejn. In-numru totali ta' kampjuni li għandhom jitlestew għall-istudju għandhom jiġu kalkolati skond il-metodoloġija li tiġi segwita.

Metodi għall-istudju preliminarju u l-istudju ewlieni huma ġeneralment l-istess, eċċezzjonijiet imsemmija fejn rilevanti.

Il-kampjuni tal-ħamrija mnixxfin bl-arja jiġu ekwilibrati billi jitħawdu għal (12 s) lejl sħih qabel jum l-eaperiment, b'volum minimu ta' 45 ċm^3 ta' 0,01 M $CaCl_2$. Wara jiżdied ċertu volum tas-soluzzjoni riżerva tas-sustanza sperimentali sa total ta' 50 ċm^3. Il-volum tas-soluzzjoni riżerva miżjud: (a) m'għandux ikun aktar minn 10 % tal-volum finali 50 ċm^3 tal-faži bl-ilma sabiex issir l-anqas bidla possibbli lin-natura tas-soluzzjoni pre-ekwilibrata; u (b) għandu jirriżulta, preferibilment, f'konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija (C_0) akbar b'żewġ ordnijiet ta' preferenza mill-anqas, ta' l-iskoperta tal-metodu analitiku, sabiex tiġi salvagwardjata l-kapaċità biex isiru mizuri eżatti ankè meta l-adsorbiment ikun qawwi (> 90 %) u biex wara jiġu stabbiliti l-iżotermi ta' l-adsorbiment. Hu rakkomandat ukoll, jekk possibbli, illi l-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza (C_0) ma taqbiżx in-nofs tal-limitu tas-solubilità tagħha.

L-eżempju li jmiss juri l-mod kif tikkalkula l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni riżerva (C_{st}). Tibda bil-ħsieb illi l-limitu ta' rivelazzjoni huwa 0,01 μg ċm^{-3} u l-adsorbiment huwa ta' 90 %; għaldaqstant, il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija trid tkun, preferibbilment, 1 μg ċm^{-3} (żewġ ordnijiet ta' kobor għola mil-limitu ta' rivelazzjoni). Jekk jiżdied il-massimu rakkiomandat tal-volum tas-soluzzjoni maħżuna, i.e. 5 sa 45 ċm^3 tas-soluzzjoni ta' ekwilibrazzjoni ta' $CaCl_2$0,01 M (= 10 % tas-soluzzjoni maħżuna għal volum totali ta' 50 ċm^3 tal-faži bl-ilma), il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna għandha tkun ta' 10 μg ċm^{-3}; jiġifieri ogħla bi tliet ordnijiet ta' kobor mil-limitu ta' rivelazzjoni tal-metodu analitiku.

Il-pH tal-faži bl-ilma għandu jitkejjel qabel u wara kuntatt mal-ħamrija peress li għandu rwol importanti fil-proċess kollu ta' l-adsorbiment, speċjalment għal sustanzi ionizzabbli.

▼B

It-taħlita titħawwad CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment. Il-ħin ta' l-ewilibriju fil-ħamrija huwa varjabbli ħafna, skond is-sustanza kimika fil-ħamrija; perjodu ta' 24 s huwa biżżejjed normalment (77). Fl-istudju preliminari, kampjuni jistgħu jinġabru b'sekwenza matul perjodu ta' taħlit ta' 48 s (pereżempju f'4, 8, 24, 48 s). Madankollu, il-ħinijiet ta' l-analiżi iridu jiġu meqjusa bi flessibilità skond l-iskeda ta' xogħol tal-laboratorju.

Hemm żewġ alternattivi għall-analiżi tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni bl-ilma: (a) il-metodu paralleli (b) il-metodu f'serje. għandu jingħad illi, għalkemm il-metodu paralleli huwa aktar tedjanti fil-kamp sperimentali, it-trattament matematiku tas-soluzzjonijiet huwa aktar sempliċi (Anness 5). Madankollu, l-għażla tal-metodoloġija li għandha tintuża, hija f'idejn il-persuna li tagħmel l-esperiment li tkun trid tqis il-faċilitajiet tal-laboratorju u r-riżorsi li huma disponibbli.

(a) Metodu paralleli: kampjuni bl-istess relazzjoni ħamrija/soluzzjoni humw ppreparati, bl-istess numru ta' intervalli ta' ħin li hu mixtieq biex isir l-istudju tal-kinetika ta' l- adsorbiment. Wara ċentrifugazzjoni u, jekk mixtieq, filtrazzjoni, il-fażi bl-ilma ta' l-ewwel pipetta tiġi miġbura bl-aktar mod komplet possibbli u titkejjel wara, pereżempju, 4 s, dik tat-tieni pipettta wara 8 s, dik tat-tielet wara 24, eċċ.

(b) Metodu f'serje: għal kull rapport ħamrija/soluzzjoni jiġi preparat biss kampjun kampjun doppju wieħed. f'intervalli determinati ta' ħin it-taħlita tiġi ċentrifugata biex il- fażijiet jiġu separati. Alikwota żgħira ta' riżorsi tiġi immedjatament analizzata għas-sustanza sperimentali; imbagħad l-esperiment ikompli bit-taħlita oriġinali. Jekk l- filtrazzjoni tiġi applikata wara ċ-ċentrifugazzjoni, il-laboratorju għandu jkollu faċilitajiet biex issir l-filtrazzjoni ta' aliquoti bl-ilma żgħar. Huwa rakkomandabbli li l-volum totali ta' laliquoti meħuda, ma jkunx aktar mjinn 1 % tal-volum totali tas-soluzzjoni, sabiex ir- rapport ħamrija/soluzzjoni ma jinbidilx b'mod sinifikattiv u biex titnaqqas il-massa tas- solute disponibbli għall-adsorbiment matul il-prova.

Il-perċentwali ta' l-adsorbiment A_{t_i} huwa kkalkolat f'kull punt ta' ħin (t^i) fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni inizjali nominali u l-konċentrazzjoni mkejla fil-ħin tal-kampjunaġġ (ti), korrett għall-ħin tal-"blank". Plots ta' l- A_{t_i} versus l-ħin (Fig. 1 Anness 5) huma magħmula sabiex jiġi vvalutat jekk inkisbitx il-pjattaforma ta' l-ekwilibriju ([1]). Il-valur K_d fl-ekwilibriju jiġi kkalkolat ukoll. Ibbażat fuq dan il-valur K_d, u bl-użu tal-Fig.1 jintagħżlu rapporti xierqa ħamrija/soluzzjoni, sabiex il-perċentwali ta' l-adsorbiment taqbeż 20 % u preferibbilment > 50 % (61). L-ekwazzjonijiet u l-prinċipji tal-plotting kollha applikabbli huma mgħotija fit-taqsima fuq id-Data u rapurtaġġ u fl-Anness 5.

1.9.2.2. *Determinazzjoni tal-ħin ta' ekwilibrazzjoni ta' l-adsorbiment u ta' l-ammont sustanza sperimentali adsorbita fl-ekwilibriju*

Kif digà msemmi, plots ta' A_{t_i} jew C_{aq}^{ads} versus il-ħin jippermettu stima tat-twettieq ta' l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment u l-ammont ta' sustanza sperimentali adsorbita fl-ekwilibriju. Il-figuri 1 u 2 fl-Anness 5 juru eżempji ta' tali plots. Il-ħin ta' l-ekwilibriju huwa dak neċessarju biex is-sistema tilħaq pjattaforma.

([1]) *Plots* tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test fil-fażi akwea C_{aq}^{ads} versus il-ħin jistgħu jintużaw ukoll għall-kalkolu tal-kisba tal-*plateau* ta' l-ekwilibriju (ara Fig. 2 fl-Anness 5).

▼B

Jekk, b'ħamrija partikolari, ma tintlaħaqx pjattaforma iżda issir żieda kontinwa, din tista' tkun dovuta għal fatturi ta' komplikazzjoni bħal biodegredazzjoni jew diffużjoni bil-mod. Biodegradazzjoni tista' tintwera' billi jirrepeta l-isperiment b'kampjun sterilizzat tal-ħamrija. Jekk anke f'dan il-każ ma tintlaħaq l-ebda pjattaforma, min qed jagħmel l-esperiment għandu jfittex fenomeni oħra li jistgħu ikunu involuti fl-istudji speċifiċi tiegħu; dan jista' jsir b'modifikazzjonijiet xierqa tal-kondizzjonijiet ta' l-esperiment (temperatura, ħin tat-taħwid, rapporti ħamrija/soluzzjoni). Ukoll, min qed jagħmel l-esperiment irid jiddeċidi jekk ikomplix il-proċedura sperimentali malgrad ta' eventwali possibilità li jintlaħaq ekwilibriju.

1.9.2.3. *L-adsorbiment fil-wiċċ tal-kontenituri u l-istabilità tas-sustanza sperimentali*

Xi informazzjoni fuq l-istabliltà tas-sustanza sperimentali u l-adsorbiment tagħha fil-wiċċ tal-kontenituri tagħha tista' tinkiseb billi ssir analiżi tal-kampjuni tal-kontroll. Jekk tiġi osservata deplezzjoni akbar minn l-iżball standard tal-metodu analitiku, tista' tkun kaużata minn degredazzjoni abiotika u/jew adsorbiment fil-wiċċ tal-kontenitur sperimentali. Distinzjoni bejn dawn iż-żewġ fenomeni tista' tintlaħaq billi jinħaslu sew il-ħitan tal-kontenitur b'volum magħruf ta' solvent xieraq u billi jiġi analizzat il-likwidu tal-ħasil għas-sustanza sperimentali. Jekk l-ebda adsorbiment ma jinstab fil-wiċċ tal-kontenituri sperimentali, il-fasda turi instabilità abiotika tas-sustanza sperimentali. Jekk jinstab adsorbiment, bdil tal-materjal tal-kontenituri sperimentali ikun neċessarju. Madankollu, data fuq l-adsorbiment tal-wiċċ tal-kontenituri sperimentali miġbura minn dan l-esperiment ma tistax tiġi estrapolata direttament lill-esperiment ħamrija/soluzzjoni. Il-preżenza ta' ħamrija taffetwa l-adsorbiment.

Informazzjoni addizzjonali fuq l-istabilità tas-sustanza sperimentali tista' tinkiseb billi jiġi stabbilit bilanċ tal-massa proġenitriċi fiż-żmien. Dan ifisser illi l-fażi bl-ilma, estratti ta' ħamrija u ħitan ta' kontenituri sperimentali jiġu analizzati għas-sustanza sperimentali. Id-differenza bejn il-massa ta' kimika sperimentali miżjuda u s-somma tal-massi kimiċi sperimentali fil-fażi bl-ilma, fl-estratti tal-ħamrija u fil-ħitan ta' kontenituri sperimentali huwa ugwali għal massa degredata u/jew volatilizzata u/jew mhux estratta. Sabiex issir determinazzjoni tal-bilanċ tal-massa, l-ekwilibriju ta' adsorbiment trid tintlaħaq matul l-perjodu ta' l-esperiment.

Il-bilanċ tal-massa jrid isir kemm fuq ħamrija kif ukoll fuq rapport ħamrija/soluzzjoni għal kull tip ta' ħamrija li fl-ekwilibriju tagħti lok għal fasda għola minn 20 % u preferibbilment > 50 %. Meta l-esperiment għar-riċerka tar-rapporti jintemm bl-analiżi ta' l-aħħar kampjun tal-ħaži bl-ilma wara 48 s, il-fażijiet iridu jiġu separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u, jekk mixtieqa, filtrazzjoni. Il-fażi bl-ilma trid tinġabar fl-akbar kwantità possibbli, biż-żieda ta' solvent ta' estrazzjoni adatt (koeffiċjent ta' estradizzjoni mhux anqas minn 95 %) mal-ħamrija biex tiġi estratta s-sustanza sperimentali. Minn l-anqas żewġ estrazzjonijiet suċċessivi huma rakkomandati. L-ammont ta' sustanza sperimentali estratt mill-ħamrija u mill-kontenitur jiġi determinat u l-bilanċ tal-massa jiġi kkalkolat (ekwazzjoni 10, data u rapurtaġġ). Jekk ikun anqas minn 90 %, is-sustanza sperimentali hija meqjusa instabbli fil-perjodu ta' ħin ta' l-esperiment. Madankollu, studji xorta jistgħu jitkomplew, għalkemm l-instabilità tas-sustanza sperimentali trid tiġi meqjusa; f'dan il-każ huwa rakkomandat biex jiġu analizzati ż-żewġ fażijiet fl-istudju prinċipali.

▼B

1.9.2.4 *Stadju 2 – Kinetika ta' l-adsorbiment għal konċentrazzjoni ta' sustanza sperimentali*

Jintużaw ħames kwalitajiet ta' ħamrija, selezzjonati minn Tabella 1. Jekk dan ikun xieraq, huwa vantaġġuż jekk tintuża kull kwalità ta' ħamrija użata fl-istudju preliminari fost dawn il-ħames kwalitajiet ta' ħamrija. F'dan il-każ, Stadju 2 m'għandux jerġa' jiġi repetut għall-kwalitajiet ta' ħamrija użati fl-istudju preliminarju.

Il-ħin ta' l-ekwilibriju, ir-rapport ħamrija/soluzzjoni, il-piż tal-kampjun tal-ħamrija, il-volum tal-faži bl-ilma f'kuntatt mal-ħamrija u il-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni huma magħżula fuq il-bażi tar-riżultati ta' l-istudji preliminarji. L-analiżi trid issir, bejn wieħed u ieħor, 2, 4, 6, 8 (possibliment ankè 10) u 24 s wara l-ħin tal-kuntatt; il-ħin tat-taħwid jista' jiġi estiż sa massimu ta' 48 s fil-każ illi sustanza kimika tirrikjedi ħin itwal biex jintlaħaq l-ekwilibriju fil-każ tar-riżultati tar-riċerka fil-qasam tar-rapporti. Madankollu, il-ħinijiet ta' l-analiżi jridu jiġu kkunsidrati b'flessibilità.

Kull esperiment (ħamrija waħda u soluzzjoni waħda) isir doppju mill-inqas biex tkun tista' tiġi vvalutata l-varjanza fir-riżultati. F'kull esperiment isir wieħed "blank". Dan jikkonsisti fil-ħamrija u fis-soluzzjoni ta' $CaCl_2$0,01 M, mingħajr iż-żieda ta' sustanza sperimentali, ta' piż u volum, rispettivament, identiku għal dak ta' l-esperiment. Sabiex ikun hemm salvagwardja għall-imprevvist, kampjun ta' kontroll bis-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni ta' $CaCl_2$0,01 M biss (mingħajr ħamrija) jiġi soġġett għall-istess proċedura sperimentali.

Il-persentaġġ ta' adsorbiment jiġi kkalkolat f'kull punt ta' ħin A_{t_i} u/jew intervall ta' ħin $A_{\Delta t_i}$ (skond il-bżonn) impinġi kontra l-ħin. Jiġu ukoll ikkalkolati l-koeffiċjent ta' distribuzzjoni K_d at equilibrium, u l-koeffiċjent ta' adsorbiment normalizzat tal-karbonju organiku K_{oc} (għall-komposti kimiċi organiċi mhux polari).

Riżultati tal-provi fuq il-kinetika ta' l-adsorbiment

Il-valur linjari K_d hu ġeneralment preċiż biżżejjed biex tkun jista' tiġi deskritta l-imġieba relattiva għas-sorbiment fil-ħamrija (35) (78) u jirrapreżenta espressjoni tal-mobilità intrinsika tal-prodotti kimiċi fil-ħamrija. Pereżempju, ġeneralment, kimiċi b' $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} huma meqjusa kwalititivament mobbli. Simili hija l-iskema ta' klassifikazzjoni tal-mobilità bbażata fuq valuri K_{oc} żviluppata minn MacCall *et al*. (16). Addizzjonalment, jeżistu skemi ta' klassifikazzjoni ta' filtrazzjoni li huma bbażati fuq ir-relażżjoni bejn K_{oc} u DT-50 ([1]) (32) (79).

Ukoll, skond studji fuq l-analiżi ta' l-iżbalji (61), valuri K_d anqas minn 0,03 cm^3 g^{-1} ma jistgħux jiġu vvalutati akkuratament minn tnaqqis fil-konċentrazzjoni fil-faži bl-ilma, ankè meta jintuża l-aktar rapport ħamrija/soluzzjoni favorevoli (mil-lat tal-preċiżjoni), i.e. 1:1. F'dan il-każ l-analiżi taż-żewġ fażijiet, ħamrija u soluzzjoni, hija rakkomandata.

([1]) DT-50: il-ħin tad-degradazzjoni għal 50 % tas-sustanza għat-test.

▼B

Rigward l-osservazzjonijiet magħmula 'l fuq, huwa rakkomandat illi jitkompla l-istudju ta' l-imġieba ta' l-adsorbiment ta' prodott kimiku fil-ħamrija u l-mobilità potenzali tiegħu billi jiġu stabbiliti l-iżotermi ta' adsorbiment skond Freundlich għal dawn is-sistemi, għal liema, id-determinazzjoni ta' K_d hija possibbli bil-protokoll sperimentali segwit f'dan il-metodu sperimentali. Determinazzjoni akkurata tkun possibbli jekk il-valur li jirriżulta billi ssir multiplikazzjoni tal- K_d mar-relazzjoni ħamrija/soluzzjoni ikun > 0,3, meta l-miżuri jkunu bbażati fuq tnaqqis fil-konċentrazzjoni fil-fażi bl-ilma (metodu indirett), jew > 0,1, meta ż-żewġ fażijiet jiġu analizzati (metodu dirett) (61).

1.9.2.5. *Stadju 3 – Iżotermi ta' adsorbiment u kinetika ta' desorbiment/iżotermi ta' desorbiment*

1.9.2.5.1. I ż o t e r m i t a ' a d s o r b i m e n t

Jintużaw ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza, li jkopru żewġ ordnijiet ta' kobor; fl-għażla ta' dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu meqjusa s-solubilità fl-ilma u l-konċentrazzjoni fl-ekwilibriju bl-ilma li jirriżulta. L-istess relazzjoni ħamrija/soluzzjoni għal kull kwalità ta' ħamrija għandha tinżamm għat-tul kollu ta' l-istudju. Il-prova ta' l-adsorbiment hija magħmula kif deskritt 'il fuq, bl-uniku differenza illi l-fażi bl-ilma tiġi analizzata darba biss fil-ħin neċessarju biex jintlaħaq l-ekwilibriju kif determinat qabel fl-Istadju 2. Il-konċentrazzjonijiet ta' l-ekwilibriju fis-soluzzjoni jiġu determinati u l-ammont adsorbit jiġi kkalkolat mill-fasda tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni jew bil-metodu indirett. Il-massa adsorbita għall-unità tal-massa tal-ħamrija tiġi mpinġija grafikament bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni fl-ekwilibriju tas-sustanza sperimentali (ara Data u rapurtaġġ).

Riżultati ta' l-esperiment għall-iżotermi ta' l-adsorbiment

Fost il-mudelli matematiċi ta' l-adsorbiment proposti s'issa, l-iżoterma Freundlich hija dik li tintuża l-iktar biex tiddeskrivi l-proċess ta' l-adsorbiment. Informazzjoni aktar dettaljata fuq l-interpretazzjoni u l-importanza tal-mudelli ta' l-adsorbiment hija previst fir-referenzi (41) (45) (80) (81) (82).

Nota: Għandu jiġi osserva illi, għal sustanzi varji, konfront bejn il-valuri ta' K_F (koeffiċjent ta' l-adsorbiment ta' Freundlich) hu possibbli biss jekk dawn il-valuri K_F huma espressi fl-istess unità (83).

1.9.2.5.2. K i n e t i k a t a d - d e s o r b i m e n t

L-għan ta' dan l-esperiment huwa illi jiġi nvestigat jekk sustanza kimika tiġix adsorbita riversibilment jew irriversibilment mill-ħamrija. Din l-informazzjoni hija mportanti, peress illi l-proċess ta' desorbiment għandu ukoll rwol importanti fl-imġieba ta' sustanza kimika f'ħamrija ta' l-għalqa. Madankollu, id-data tad-desorbiment tikkontribwixxi utilment għall-mudellar kompjuterizzat tal-filtrazzjoni u għas-simulazzjoni tas-sustanza li tddewweb. Jekk studju ta' desorbiment ikun mixtieq, huwa rakkomandat li l-istudju rakkomandat hawn taħt isir fuq kull sistema fejn determinazzjoni akkurata ta' K_d fil-esperiment tal-kinetika ta' l-adsorbiment preċedenti tkun possibbli.

B'mod analogu ma' l-istudju tal-kinetika ta' l-adsorbimetnt, biex tiġi studjata l-kinetika tad-desorbiment hemm żewġ metodi: (a) il-metodu paralleli u (b) il-metodu f'serje. L-għażla tal-metodoloġija li għandha tapplika titħalla f'idejn min ikun qed jagħmel l-esperiment li jkun irid jikkonsidra il-faċilitajiet disponibbli u r-riżorsi tal-laboratorju.

▼B

(a) Metodu paralleli: għal kull ħamrija magħżula għall-istudju fuq id-desorbiment, jitlestew kampjuni bl-istess relazzjoni ħamrija/-soluzzjoni, daqs kemm hemm intervalli ta' ħin li fihom tixtieq tiġi studjata l-kinetika tad-desorbiment. Preferibilment, jiġu applikati l-istess intervalli ta' ħin utilizzati għall-kinetika ta' l-adsorbiment; madankollu, il-ħin totali jista' jiġi estiż skond in-neċessità sabiex is-sistema tkun tista' tilħaq l-ekwilibriju ta' desorbiment. F'kull esperiment (ħamrija waħda, soluzzjoni waħda) isir wieħed "blank". Dan jikkonsisti fil-ħamrija u fis-soluzzjoni 0,01 M ta' $CaCl_2$, mingħajr is-sustanza sperimentali, u ta' piż u valur, rispettivament, identiku għal dawk ta' l-esperiment. Bħala kampjun ta' kontroll, is-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni 0,01 M ta' $CaCl_2$ (mingħajr ħamrija) hija soġġetta għall-istess proċedura sperimentali. It-taħlit kollu tas-soluzzjoni mal-ħamrija jitħawwad sakemm jintlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (kif determinat qabel fl-Istadju 2). Imbagħad, il-fażijiet jiġu separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u l- fażijiet bl-ilma, kemm ikun possibbli, jitneħħew. Il-volum ta' soluzzjoni mneħħi jiġi sostitwit b'volum ugwali ta' 0,01 M $CaCl_2$ mingħajr is-sustanza sperimentali u t-taħlit il-ġdid jiġi mħawwad mill-ġdid. Il-fażi bl-ilma ta' l-ewwel pipetta tiġi miġbura bl-aktar mod komplet possibbli u tiġi mkejla, pereżempju, wara 2 s, dik tat-tieni pipetta wara 4 s, dik tat-tielet wara 6 s, eċċ. CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment.

(b) Metodu f'serje: wara l-esperiment tal-kinetika ta' l-adsorbiment, it-taħlita tiġi ċentrifugata u l-fażi bl-ilmam, sakemm ikun possibbli, titneħħa. Il-volum tas-soluzzjoni li jitneħħa jiġi sostitwit b'volum ugwali ta' $CaCl_2$0,01 M, mingħajr is-sustanza sperimenmtali. It-taħlita l-ġdida tiġi mħawwda CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment. Matul dan il-perjodu ta' żmien, f'intervalli definiti ta' ħin, it-taħlita tiġi ċentrifugata biex jiġu separati l-fażijiet. Alikuota żgħira tal-fażi bl-ilma tiġi immedjatament eżaminata għas-sustanza sperimentali; imbagħad, l-esperiment ikompli bit-taħlita oriġinali. Il-volum ta' kull alikwota individwali għandu jkun inqas minn 1 % tal-volum totali. Tiġi miżjuda mat-taħlita l-istess kwantità ta' soluzzjoni friska ta' $CaCl_2$0,01 M biex jinżamm l-istess rapport ħamrija/soluzzjoni, u tkompli tiġi mġawda sa l-intervall ta' ħin li jmiss.

Il-perċentwlai tad-desorbiment jiġi kkalkolatf'kull punt ta' ħin (D_{t_i}) u/jew intervall ta' ħin ($D_{\Delta t_i}$) (skond l-eżiġenzi ta' l-istudju) u tiġi mpinġija grafikament kontra l-ħin. Jiġi kkalkolat ukoll il-koeffiċjent tad-desorbiment Kdes fl-ekwilibriju. L-ekwazzjonijiet applikabbli kollha huma msemmija f'Data u Rapurtaġġ u Anness 5.

Riżultati ta' l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment

Tpinġija grafika kommuni tal-persentaġġ ta' desorbiment D_{t_i} u l-adsorbiment A_{t_i} kontra l-ħinjippermettu stima tar-riversibilità tal-proċess ta' l-adsorbiment. Jekk l-ekwilibriju tad-desorbiment jintlaħaq ankè f'darbtejn il-ħin ta' l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment, u d-desorbiment totali ikun aktar minn 75 % ta' l-ammont adsorbit, l-adsorbiment huwa meqjus irriversibbli.

1.9.2.5.3. Iżotermi tad-desorbiment

L-iżotermi tad-desorbiment skond Freundlich huma determinati fuq ħamrija użata fl-esperiment fuq l-iżotermi ta' l-adsorbiment. Il-prova tad-desorbiment issir kif deskritta fit-taqsima Kinetika tad-desorbiment, bl-unika differenza illi il-fażi bl-ilma tiġi analizzata darba biss, fl-ekwilibriju tad-desorbiment. Jiġi kkalkolat l-ammont ta' sustanza sperimentali desorbit. Il-kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment tiġi mpinġija grafikament bħalha funzjoni tal-konċentrazzjoni ta' l-ekwilibriju tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni (ara Data u rapurtaġġ u Anness 5).

▼B

2. ***DATA* U RAPURTAĠĠ**

Id-*data* analitika tiġi preżentata f'forma ta' tabella (ara Anness 6). Jingħataw il-miżuri u l-medji individwali kalkolati. Jingħataw rappreżentazzjonijiet grafiċi ta' l-iżotermi ta' l-adsorbiment. Il-kalkoli jsiru kif deskritt hawn taħt.

Għall-iskop tal-prova, huwa meqjus illi l-piż ta' 1 cm_3 ta' soluzzjoni bl-ilma huwa 1 g. Ir-rapport ħamrija/soluzzjoni jista' jiġi espress f'unità ta' w/w jew w/vol għall-istess figura.

2.1. ADSORBIMENT

L-adsorbiment A_{t_i}) huwa definit bħala l-persentaġġ tas-sustanza adsorbita fuq il-ħamrija relatata mal-kwantità preżenti fil-bidu tal-prova, taħt il-kondizzjonijiet sperimentali. Jekk is-sustanza sperimentali tkun stabbli u ma t'adsorbix b'mod sinifikattiv mal-ħajt tal-konteniturA_{t_i}, tiġi kkalkolata f'kull punt ta'ħin t_1, skond l-ekwazzjoni:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

meta:

A_{t_i} = presentaġġ ta' adsorbiment fil-punt ta' ħin t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fil-ħin t_i (μg);

m_0 = massa tas-sustanza sperimentali fil-pipetta fil-bidu tal-prova (μg).

Informazzjoni dettaljata fuq kif għandu jiġi kkalkolat il-persentaġġ ta' adsorbiment A_{t_i} għall-metodi paralleli u f'serje hija mogħtija fl-Anness 5.

Il-koeffiċjent ta' distribuzzjoni K_d huwa r-relazzjoni bejn il-kontenut tas-sustanza fil-fażi tal-ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fis-soluzzjoni bl-ilma, taħt il-kondizzjonijiet tal-prova meta jintlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (4)$$

meta:

$C_s^{ads}(eq)$ = kontenut tas-sustanza adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-fażi bl-ilma fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg cm^{-3}). Din il-konċentrazzjoni tiġi analitikament determinata billi jitqiesu il-valuri mogħtija mill-"blanks"

$m_s^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg);

m_{soil} = kwantità tal-fażi ħamrija, espressa f'massa xotta tal-ħamrija (g);

V_0 = volum inizjali tal-fażi bl-ilma f'kuntatt mal-ħamrija (cm^3).

Ir-relazzjoni bejn A_{eq} u K_d hija mogħtija minn:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

meta:

A_{eq} = persentaġġ ta' adsorbiment fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment, %.

Il-koeffiċjent normalizzat ta' l-adsorbiment tal-karbonju organiku K_{oc} jirrelata l-koeffiċjent ta' distribuzzjni Kd mal-kontenut ta' karbonju organiku tal-kampjun tal-ħamrija:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (6)$$

:meta

%OC = persentaġġ tal-karbonju organiku fil-kampjun tal-ħamrija ($g \ g^{-1}$).

Il-koeffiċjent K_{oc} jirrapreżenta valur singolu li jikkaratterizza l-partizzjoni tas-sustanzi kimiċi organiċi li mhumiex polari bejn il-karbonju organiku li jinstab fil-ħamrija jew fis-sediment u l-ilma. L-adsorbiment ta' dawn il-kimiċi huwa korrelatat mal-kontenut organika tas-solidu sorbeni (7); għalhekk, valuri K_{oc} jiddependu fuq karatteristiċi speċifiċi tal-frazzjonijiet umiċi li jvarjaw konsiderevolment fil-kapaċità tas-sorbiment, dovut għad-differenzi fl-oriġini, ġenesi, eċċ.

2.1.1. **Iżotermi ta' l-adsorbiment**

L-ekwazzjoni ta' l-iżotermi ta' adsorbiment ta' Freundlich trirrelata l-ammont tal-prova sperimentali adsorbita mal-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju (ekwazzjoni 8).

Id-*data* tiġi trattata kif deskritt f Adsorbiment' u, għal kull pipetta jiġi kkalkolat il-kontenut tas-sustanza sperimentali adsorbit fuq il-ħamrija wara l-prova ta' l-adsorbiment ($C_s^{ads}(eq)$ banda oħra indikat bħal x/m). Jitlaq bl-idea illi l-ekwilibriju ntlaħaq u illi $C_s^{ads}(eq)$jirrapreżenta l-valur ta' l-ekwilibriju:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{soil}} \ (\mu g \ g^{-1}) \qquad (7)$$

L-ekwazzjoni ta' l-adsorbiment ta' Freundlich hija murija f (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g \ g^{-1}) \qquad (8)$$

jew fil-forma linjari

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \qquad (9)$$

meta:

K_F^{ads} = Freundlich il-koeffiċċjent ta' l-adsorbiment; id-dimensjoni tiegħu huwa ta' $ċm^3 \ g^{-1}$ biss jekk 1/n = 1; fil-każi l-oħra kollha, is-*slope* 1/n huwa introdott fid-dimensjoni ta' K_F^{ads} 1-1/n 3 1/n - 1 (µg (ċm) g);

n = kostanti tar-regressjoni; 1/n ġeneralment ivarja bejn 0,7 - 1,0, li jindika illi d-data ta' sorbiment frekwentement tvarja ftit mil-linearità.

Ekwazzjonijiet (8) u (9) huma mpinġija grafikament u jiġi kkalkolati l-valuri ta' K_F^{ads} u 1/n permezz ta' analiżi ta' rigressjoni bl-applikazzjoni ta' -ekwazzjoni 9. Jiġi kkalkolat il- koeffiċjent tal-korrelazzjoni r_2 ta' l-ekwazzjoni logartimika is also calculated. Eżempju ta' tali grafika hia mogħtija f'Fig. 2.

▼B

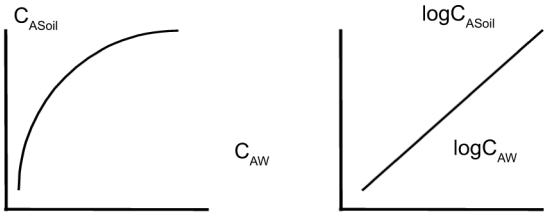


Fig. 2. Grafika ta' adsorbiment skond Freundlich, normali u linearizzata

2.1.2. **Bilanċ tal-massa**

Il-bilanċ tal-massa (MB) huwa definit bħalha l-persentaġġ tas-sustanza li tista' tiġi analitikament miġbura wara prova ta' adsorbiment konta l-ammont nominali tas-sustanza fil-bidu tal-prova.

It-trattament tad-data ma jkunx l-istess jekk is-solvent ikun jista' jitħallat kompletament ma' l-ilma. Fil-każ ta' solvent li jista' jitħallat ma' l-ilma, it-trattament ta' data deskritta taħt "Desorbiment" jista' jiġi applikat biex jiġi stabbilit l-ammont ta' sustanza miġbura mill-estrazzjoni tas-solvent. Jekk is-solvent jitħallat inqas faċilment ma' l-ilma, trid issir determinazzjoni ta' l-ammont miġbur.

Il-bilanċ tal-massa MB għall-adsorbiment jiġi kkalkolat kif ġej; huwa preżunt illi (m_E) jikkorrispondi għas-somma tal-massa tal-prodotti kimiċi estratti mill-ħamrija u mill-wiċċ tal-kontenitur permezz ta' solvent organiku:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}\ (\%) \qquad (10)$$

meta:

MB = bilanċ tal-massa(%)

m_E = massa totali tal-prova sperimentali estratta mill-ħamrija u mill-ħitan tal-kontenitur sperimentali f'żewġ stadji (μg);

C_0 = konċentrazzjoni inizjali tal-massa tas-soluzzjoni sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija (μg cm^{-3});

V_{rec} = volum tas-supernatant miġbur wara l-ekwilibriju ta' l- adsorbiment (cm^{-3}).

2.2. DESORBIMENT

Id-desorbiment (D) huwa definit bħala l-persentaġġ tas-sustanza sperimentali li tiġi desorbita, b'referenza għall-kwantità tas-sustanza preċedentement adsorbita, fil- kondizzjonijiet sperimentali:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

meta:

D_{t_i} = persentaġġ ta' desorbiment f'punt ta' ħin t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija f'punt ta' ħin (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' -adsorbiment (μg).

Informazzjoni dettaljata fuq kif għandu jiġi kkalkolat il-persentaġġ ta' desorbiment D_{t_i} għall-metodi paralleli u f'serje hu mgħoti fl-Anness 5.

Il-koeffiċjent tad-desorbiment apparenti (K_{des}), taħt il-kondizzjonijiet sperimentali, huwa r-rapport bejn il-kontenut tas-sustanza li tibqa fil-fażi ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza desorbita fis-soluzzjoni bl-ilma, meta jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)\ V_T}{m_{aq}^{des}(eq) \qquad m_{soil}} \ (cm^3\ g^{-1}) \tag{12}$$

meta:

K_{des} = il-koeffiċjent tad-desorbiments ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa totali tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija fl-ekwilibriju tad- desorbiment (μg)

V_T = volum totali tal-fażi bl-ilma f'kuntatt mal-ħamrija matul il-prova tal-kinetika tad-desorbiment (cm^3).

Gwida biex jiġi kkalkolat $m_{aq}^{des}(eq)$ hija mogħtija fl-Anness 5 taħt l-intestatura "Desorbiment".

Rimarka:

Jekk il-preċedenti prova ta' adsorbiment, issir bil-metodu paralleli, il-volum V_T fl-ekwazzjoni 12 huwa meqjus ugwali għal V_0.

2.2.1. **Iżotermi tad-desorbiment**

L-ekwazzjoni ta' l-iżotermi tad-desorbiment ta' Freundlich jikkollegaw il-kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa adsorbita fuq il-ħamrija mal-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju tad-desorbiment (ekwazzjoni 16).

Għal kull pipetta, il-kontenut tas-sustanza li jibqa adsorbit fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment jiġi kkalkolat kif ġej:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \ (\mu g\ g^{-1}) \tag{13}$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ jiġi definit bħalha:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \tag{14}$$

fejn:

$C_s^{des}(eq)$ = kontenut tas-sustanza sperimentali li jibqa' adsorbit fuq il-ħamrija fl-s ekwilibriju tad-desorbiment (μg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = il-massa tas-sustanza determinata b'mod analitiku fil-fażi akwea fl-ekwilibriju tad-desorbiment (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = il-massa tas-sustanza għat-test imħolli mill-ekwilibriju minħabba r-rimpjazzar inkomplet tal-volum (μg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = il-massa tas-sustanza fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volum tas-soluzzjoni meħud mill-pipetta għall-kejl tas-sustanza sperimentali (cm^3);

V_R = volum tas-supernatant mneħħi mill-pipetta wara li jkun intlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment u sostitwit bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3);

L-ekwazzjoni ta' desorbiment skond Freundlich hija mogħtija f (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

jew fil-forma lineari

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

meta:

K_F^{des} = koeffiċjent ta' desorbiment skond Freundlich;

n = kostanti ta' rigressjoni;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-fażi bl-ilma fl-ekwilibriju tad-desorbiment (ug cm-^{3}).

L-ekwazzjonijiet 16 u 17 jistgħu jitpinġew grafikament u il-valur ta' $K_F{}^{des}$ u 1/n jiġu kkalkolati bl-analiżi tar-rigressjoni bl-użu ta' l-ekwazzjoni 17.

Rimarka:

Jekk l-esponenti 1/n ta' adsorbiment jew desorbiment, skond Freundlich, huwa ugwali għal 1, il-vinkoli kostanti ta' l-adsorbiment jew tad-desorbiment skond Freundlich (KF u KF) ikunu ugwali, rispettivament, għal kostanti ta' l-ekwilibriju fl-adsorbiment jew fid-desorbiment (K_F^{ads} u K_F^{ads}), u it-tpinġija grafika ta' C_s vs C_{aq} tkun lineari. Jekk l-esponenti ikunu differenti minn 1, it-tpinġija grafika ta' C_s vs C_{aq} ma tkunx lineari u l-kostanti ta' l-adsorbiment u d-desorbiment ivarjaw matul l-iżotermi.

2.2.2. **Rapport tal-prova**

Ir-rapport tal-prova għandu jindika l-informazzjoni li ġejja:

— Identifikazzjoni kompleta tal-kampjuni tal-ħamrija użat inkluż:

— referenza ġeografika tal-lokalità (latitudni, lonġitudni),

— data meta jittieħed il-kampjun,

▼B

— skema ta' impieg (e.ż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.),

— fond ta' fejn jittieħed il-kampjun,

— kontenut f'ramel/torba/tafal,

— valuri tal-pH (bħal CaCl2 0,01 M),

— kontenut f'karbonju organiku,

— kontenut f'sustanza organika,

— kontenut f'nitroġenu,

— rapport C/N,

— kapaċità ta' skambjar katjoniku (mmol/kg),

— l-informazzjoni kollha dwar il-kollezzjoni u l-ħażna tal-kampjun tal-ħamrija,

— meta approprjat, l-informazzjoni kollha rilevanti għall-interpretazzjoni ta' l-adsorbiment desorbiment tas-sustanza sperimentali,

— referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru,

— informazzjoni fuq is-sustanza sperimentali, kif xieraq,

— temperatura ta' l-esperimenti,

— kondizzjonijiet taċ-ċentrifugazzjoni,

— proċedura analitika użata biex tiġi analizzata s-sustanza sperimentali,

— justifikazzjoni għall-użu ta' kwalsiasi aġent solubilizzanti għattlestija tas-soluzzjoni maħżuna tas-sustanza sperimentali,

— spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet magħmula fil-kalkoli, jekk rilevanti,

— data skond il-formularju (Anness 6) u preżentazzjonijiet grafiċi,

— l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jistgħu ikunu utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati tal-provi.

3. **REFERENZI**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. AND Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (Koc) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health jew especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R. C., Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M. H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), "Adsorptions-und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), "Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), “An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils”. J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G. G. (1969), “Molecular structure of herbicides and their sorption by soils”. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). “Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor”. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), “Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology”. J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), “Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil”. Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), “Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), “Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), “Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners”. Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), “Adsorption in organic chemicals” in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, “Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils”. Weed Sci. 19: pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), “Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils”. Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), “Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations” in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), “Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase”, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. “Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), "Precision in pesticide adsorption measurements". Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106". Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), "Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), “A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), “Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), “Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), “Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité”. Revue de l'Agric., 34 (4), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), “Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), “HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test”. Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), “HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases”. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), “The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), “The retention processes: mechanisms” in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), “Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), “Interpretation and use of sorption isotherms” in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), “Studies in adsorption: XI A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils”. J. Chem. Soc., pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), “Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption”. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), “Anomalies in the Freundlich equation”, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

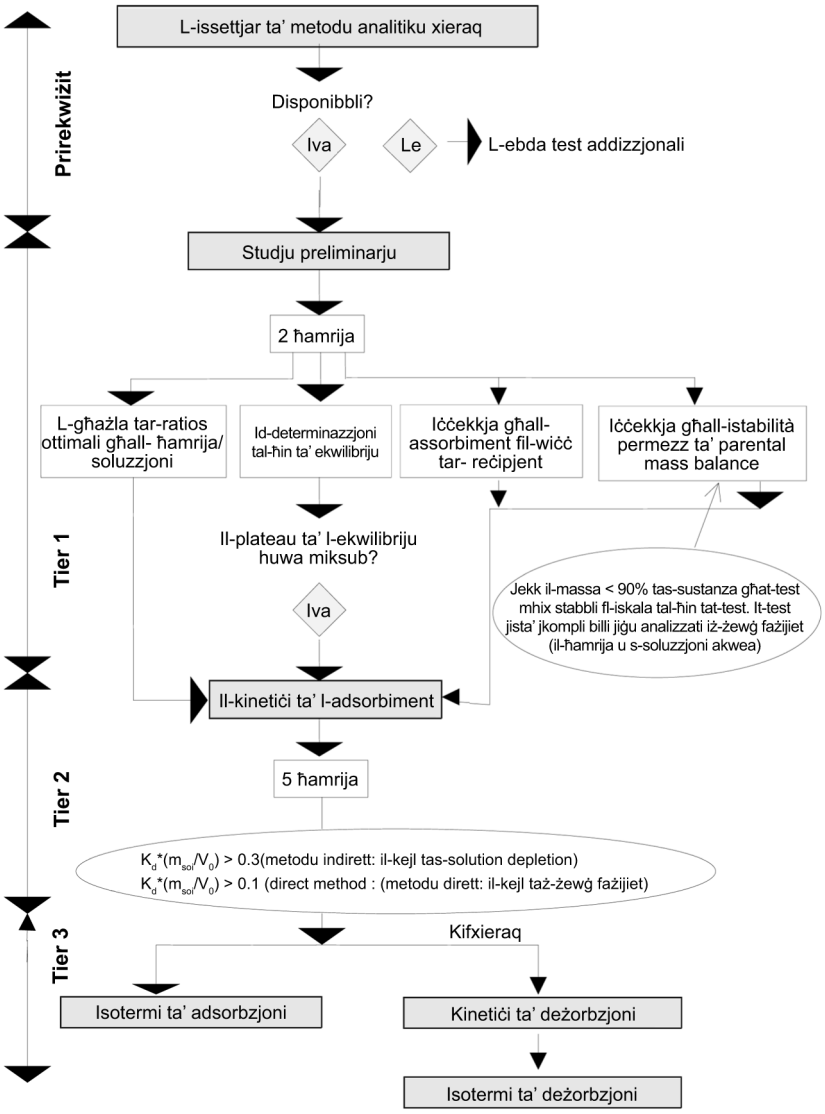
(84) Guth, J. A., (1985), “Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

ANNESS 1

Skema tal-prova



▼B

ANNESS 2

INFLUENZA TA' PREĊIŻJONI TA' METODU ANALITIKU U BIDLA FIL-KONĊENTRAZZJONI FUQ PREĊIŻJONI TA' RIŻULTATI TA' L-ASSORBIMENT

Mit-tabella li ġejja (84) jidher ċar li meta d-differenza bejn il-massa inizjali (m_0=110 µg) u lads massa ta' l-ekwilibriju (m_{aq}(eq)=100 µg) tas-sustanza għat-test fis-soluzzjoni hi ċkejkna ħafna, żball ta' 5 % fil-kejl tar-riżultati tal-konċentrażżjoni ta' l-ekwilibriju fi żball ta' 50 % fil-kalkolu tal-massa tas-sustanza adsorbita fil-ħamrija (m_s^{ads}(eq)) u ta' 52,4 % fil-kalkolu ta' K_d.

Lammont ta'ħamrija m_{soil} = 10 g

Il-volum tas-soluzzjoni V_0 = 100 cm^3

	m_{aq}^{ads}(eq) (µg)	C_{aq}^{ads}(eq) (µg cm^{-3})	R	m_s^{ads}(eq)* (µg)	C_s^{ads}(eq)* (µg g^{-1})	R‡	K^d*	R‡
m_0 = 110 µg jew C_0=1,100 µg/cm^3	**GĦAL A = 9 %**							
	100	1,000	true value	10	1,00	true value	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
m_0 = 110 µg jew C_0=1,100 µg/cm^3	**GĦAL A = 55 %**							
	50,0	0,500	Valur aawtentiku	60,0	6,00	Valur awtentiku	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
m_0 = 110 µg jew C_0=1,100 µg/cm^3	**FOR A = 99 %**							
	1,100	0,011	true value	108,9	10,89	true value	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)]V_0}{m_{soil}} . Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

m_s^{ads}(eq) = il-massa tas-sustanza għat-test fil-fażi tal-ħamrija f'ekwilibriju, µg;

m_{aq}^{ads}(eq) = il-massa tas-sustanza għat-test fil-fażi tal-ħamrija f'ekwilibriju, µg;

C_s^{ads}(eq) = il-kontenut tas-sustanza għat-test fil-fażi tal-ħamrija f'ekwilibriju, µg g^{-1};

C_{aq}^{ads}(eq) = konċentrazzjoni ta' massa tas-sustanza għat-test fil-fażi akwea f'ekwilibriju, µg cm^{-3};

R = żball analitiku fid-determinazzjoni tal- m_{aq}^{ads}(eq);

R‡ = żball kalkkulat minħabba l-iżball analitiku R.

▼B

ANNESS 3

METODI TA' TEKNIKA TA' STIMA GĦAL K_D

1. Tekniki ta' kalkolu jippermettu t-tbassir ta' K_d ibbażata fuq il-korrelazzjoni ma', pre eżempju, P_{ow} valuri (12)(39)(63-68), id-*data* tas-solubilità ta' l-ilma (12)(19)(21)(39)(68-73), jew id-*data* tal-polarità derivata bl-applikazzjoni ta' HPLC fuq il-faži reversed (74-76). Kif jidher fit-Tabelli 1 u 2, huwa K_{oc} jew K_{om} li huma kkalkulati minn dawn l-ekwazzjonijiet imbagħad, indirettament, il-K_d mill-ekwazzjonijiet:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1})$$

2. Il-kunċett ta' dawn il-korrelazzjonijiet huwa bbażat fuq żewġ suppożizzjonijiet: (1) hija l-materja organika tal-ħamrija li prinċiparjament tinfluenza l-assorbiment ta' sustanza; u (2) l-interactions involuti huma prinċiparjament non-polari. B'riżultat ta' dan, dawn il-korrelazzjonijiet: (1) m'humiex, jew huma biss sa ċertu punt, applikabbli għal sustanzi polari, u (2) m'humiex applikabbli f'każijiet fejn il-kontenut tal-materja organika tal-ħamrija hija żgħira ħafna (12). Barra dan, għalkemm instabu korrelazzjonijiet sodisfaċenti bejn P_{ow} u assorbiment (19), ma jistax jingħad l-istess għar-relazzjoni bejn is-solubilità ta'l-ilma u miżura ta' assorbiment (19) (21); s'issa l-istudji huma kontradittorji ħafna.

3. Xi eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-koeffiċjent ta' l-assorbiment u l-koeffiċjent tat-taqsima ta' ilma-ottan, kif ukoll is-solubilità ta' l-ilma huma mogħtija f'Tabelli 1 u 2, ripettivament.

Tabella 1.

Eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-ko-effiċjent tad-distribuzzjoni ta' assorbiment u l-ko-effiċjent tat-taqsima ta' ilma-ottan; għal iktar eżempji (12) (68)

Sustanzi	Korrelazzjonijiet	Awturi:
Ureas sostituti	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Fihom il-kloru aromatiku	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Diversi pestiċidi	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Idrokarbon aromatiku	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabella 2.

Eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-ko-effiċjent tad-distribuzzjoni ta' assorbiment u solubilità ta' l-ilma; għal iktar eżempji ara (68) (69)

Kompost	Korrelazzjonijiet	Awturi
Diversi pestiċidi	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Sustanzi li fihom il-kloru, alifatiċi, u aromatiċi	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) – (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α- naftal	$\log K_{oc} = 4{,}273 – 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Sustanzi aromatiċi, alifatiċi u ċikliċi	$\log K_{oc} = - 1{,}405 – 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953 (mp-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Diversi komposti	$\log K_{om} = 2{,}75 – 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

ANNESS 4

KALKOLI BIEX JIĠU DEFINITI L-KONDIZZJONIJIET TA' L-AZZJONI ĊENTRIFUGA

1. Il-ħin ta' azzjoni ċentrifuga jingħata bil-formula li ġejja, jekk nassumu li hemm partiċelli sferikali:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Għal skopijiet ta' simplifikazzjoni, il-parametri kollha huma deskritti f'unitajiet non-SI (g, cm).

fejn:

ω = veloċità tar-rotazzjoni (=2 p rpm/60), rad s^{-1};

rpm = dawriet sħaħ għal kull minuta

η = viskożità tas-soluzzjoni, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = radju tal-partiċella, cm

p_s = densità tal-ħamrija, g cm^{-3};

p_{aq} = densità tas-soluzzjoni, g cm^{-3};

R_t = distanza miċ-ċentru ta' rotor ċentrifugu sal-wiċċ tas- soluzzjoni fit-tubu ċentrifugu, cm;

R_b = distanza miċ-ċentru tar-rotor ċentrifuga sal-qiegħ tat- tubu ċentrifugu, cm;

R_b-R_t = l-għoli tal-ħamrija/taħlita tas-soluzzjoni fit-tubu ċentrifugu, cm.

Fil-prattika ġenerali, jiġu użati d-doppju tal-ħinijiet ikkalkulati biex tiġi assigurata separazzjoni kompleta.

2. L-ekwazzjoni (1) tista' tiġi ssimplifikata iktar jekk nikkunisdraw il-viskożità (η) u d- densità (ρ_{aq}) tas-soluzzjoni bħala daqs il-viskożità u d-densità ta' ilma f 25 °C; għalhekk, n = 8,95 × 10^{-3}g ^{1}cm-^{1} up$_{aq}$ = 1,0 g.cm^{-3}.

Imbagħad, il-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga jiġi mogħti bl-ekwazzjoni (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - l)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Mill-ekwazzjoni 2 jidher ċar li ż-żewġ parametri huma importanti biex tiġi definita l-kondizzjoni ta' l-azzjoni ċentrifuga, i.e. ħin (t) u velocità (rpm), sabiex tinkiseb is-separazzjoni tal-partiċelli ta' daqs speċifiku (fil-każ tagħna radju ta' μm): (1) id-densità tal-ħamrija u (2) it-tul tat-taħlita fit-tubu ċentrifugu (R_b-R_t), i.e. id-distanza li partiċella tal-ħamrija tiksi mill-wiċċ tas-soluzzjoni sal-qiegħ tat-tubu; ovvjament, għal volum fiss it-tul tat-taħlita fit-tubu sejjer jiddependi fuq ir-radiċi kwadrata tar-radju tat-tubu.

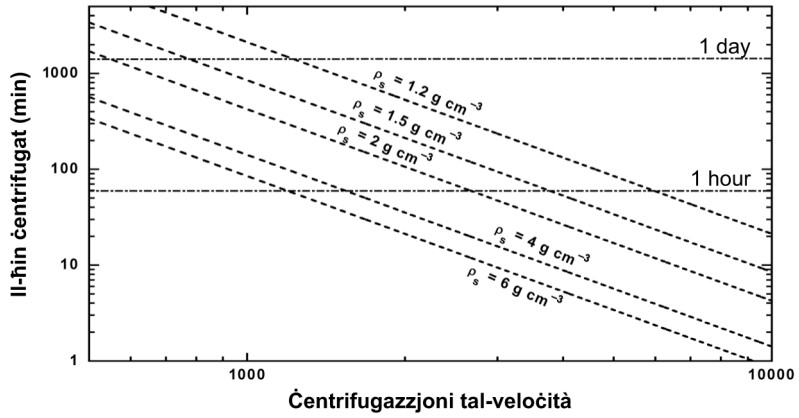
4. Fig. 1 jippreżenta varjazzjonijiet fil-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versu veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal densitajiet ta' ħamrija differenti (ρs) (Fig. 1a) u tulijiet differenti tat-taħlita fit-tubi ċentrifugi(p_s) (Fig. 1b). Minn Fig. 1a l-influenza tad-densità tal-ħamrija tidher ovvja; per eżempju, għall-azzjoni ċentrifuga klassika ta' 3000 rpm il-ħin ta l-azzjoni ċentrifuga huwa bejn wieħed u ieħor 240 min. għal 1,2 g cm^3 densità tal-ħamrija, waqt li huwa 50 min. biss għal 2,0 g cm^{3} Bl-istess mod, minn Fig. 1b, għal azzjoni ċentrifuga klassika ta' 3000 rpm il-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga huwa bejn wieħed u ieħor 50 min. għal tul tat-taħlita ta' 10 cm u huwa ta' 7 min. biss għal tul ta' 1 cm. Madankollu, huwa importanti li tinstab l-aħjar relazzjoni bejn l-azzjoni ċentrifuga li teħtieġ l-inqas tul possibbli u handling faċli għall-esperimentatur biex jissepera l-phases wara l-azzjoni ċentrifuga.

▼B

5. Barra dan, meta jiġu definiti l-kondizzjonijiet esperimentali għas-separazzjoni ta' phases tal-ħamrija/soluzzjoni, huwa importanti li tiġi kkunsidrata l-possibiltà ta' l-eżistenza tat-tielet "pseudo-phase", il-kollojde. Dawn il-partiċelli, ta' daqs inqas minn 0,2 μm, jista' jkollhom impatt importanti fuq il-mekkaniżmu ta' l-assorbiment sħiħ ta' sustanza f suspension tal-ħamrija. Meta l-azzjoni ċentrifuga tiġi esekwita kif spjegat hawn fuq, kollojde jibqgħu fl-aqueous phase u huma suġġetti għal analiżi flimkien m' l-aqueous phase. Għalhekk, l-informazzjoni dwar l-impatt tagħhom tintilef

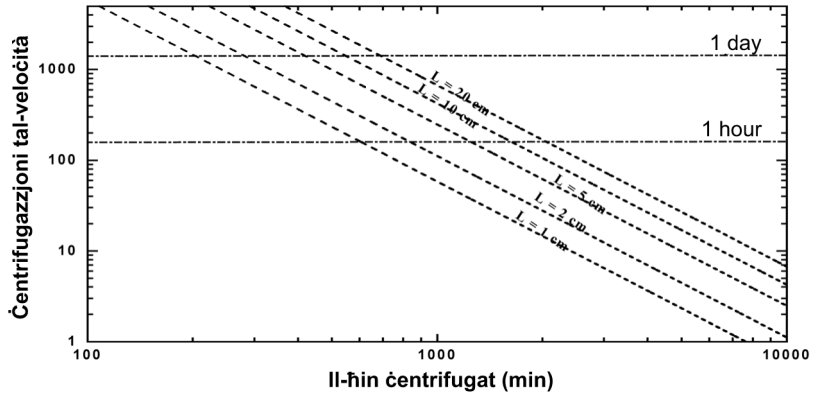
Jekk il-laboratorju amministrattiv ikollu faċilitajiet ta' azzjoni ultra-ċentrifuga jew ultrafiltrazzjoni, l-assorbiment/desorption ta' sustanza fil-ħamrija tista' tiġi studjata fiktar dettall, inkluża informazzjoni dwar l-assorbiment tas-sustanza fuq il-kollojde. F'dan il-każ, azzjoni ultra-ċentrifuga b'60 000 rpm/min. jew ultrafiltrazzjoni b'porożità tal-filtru ta' 100 000 Daltons għandha tiġi applikata sabiex jiġu sseparati it-tliet phases, ħamrija, kollojde, soluzzjoni. Il-protokoll ittestjat għandu jiġi wkoll modifikat skond il-bżonn, sabiex it-tliet phases kollha jkunu suġġetti għal analiżi tas-sustanza.

Fig. 1a.



Varjazzjonijiet tal-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versu l-veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal densitajiet ta' ħamrija differenti (ρ_s), R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g s^{-1}cm^{-1} u ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} f 25 °C.

Fig. 1b.



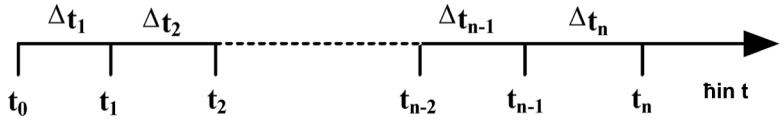
Varjazzjonijiet tal-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versu veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal tulijiet differenti tat-taħlita fit-tubu ċentrifugu (Rb -Rt) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g s^{-1}cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} f' 25 °C u ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

ANNESS 5

KALKOLU TA' ASSORBIMENT A (%) U DESORPTION D (%)

L-iskema tal-ħin tal-proċedura hija:



Għall-kalkoli kollha huwa meqjus li s-sustanza tat-test hija stabbli u ma tassorbix b'mod sinifikanti mal-ġnub tal-kontenitur.

ASSORBIMENT A (A %)

(a) *Metodu parallel*

L-assorbiment perċentwali huwa kkalkulat għal kull tubu tat-testijiet (i) f'kull punt ta' ħin (t_i), skond l-ekwazzjoni:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

It-termini ta' din l-ekwazzjoni jistgħu jiġu kkalkulati kif ġej:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

fejn:

A_{ti} = il-perċentwal ta' l-assorbiment (%) f'dan il-punt tal-ħin t_i;

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa tas-sustanza ttestjata fuq il-ħamrija fil-ħin t_i li l-analiżi ġiet esekwita (μg)

m_0 = massa tas-sustanza tat-test fit-tubu tat-testijiet, fil-bidu tat-test (μg)

C_0 = konċentrazzjoni tal-massa inizjali tas-soluzzjoni tat-test f'kuntatt mal- ħamrija (μg cm^{-3});

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fl-aqueous phase fil-ħin t_i li fih ġiet esekwita l-analiżi (μg cm^{-3}); din il-konċentrazzjoni hija ffissata analitikament meta jitqiesu l-valuri mogħtija mill-

V_0 = volum inizjali tas-soluzzjoni ttestjata mal-ħamrija (cm^3).

Il-valuri tal-persentaġġ ta' l-assorbiment A_{t_i} jew $C_{aq}^{ads}(t_i)$ huma pplottjati versu ħin u huwa ddeterminat il-ħin li jittieħed biex jintlaħaq l-ekwilibriju tas-sorption. Eżempji ta' plots bħal dawn huma mogħtija f'Fig. 1 u Fig. 2 rispettivament.

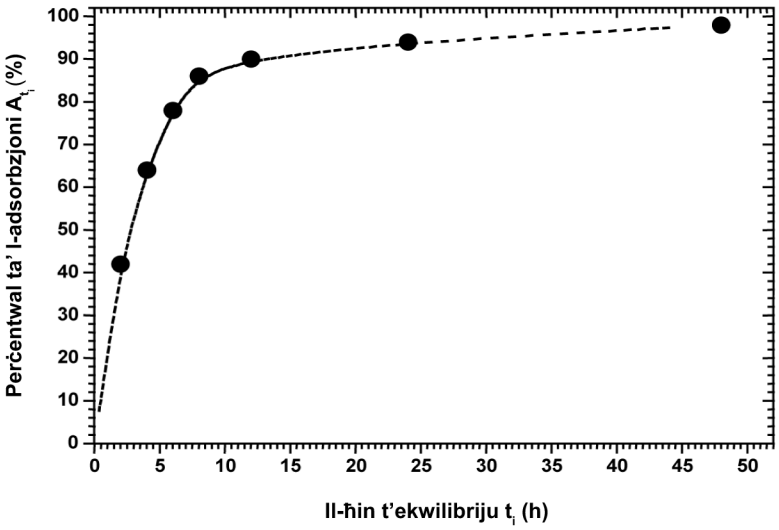


Fig. 1.

Plot ta l-ekwilibriju ta' l-assorbiment

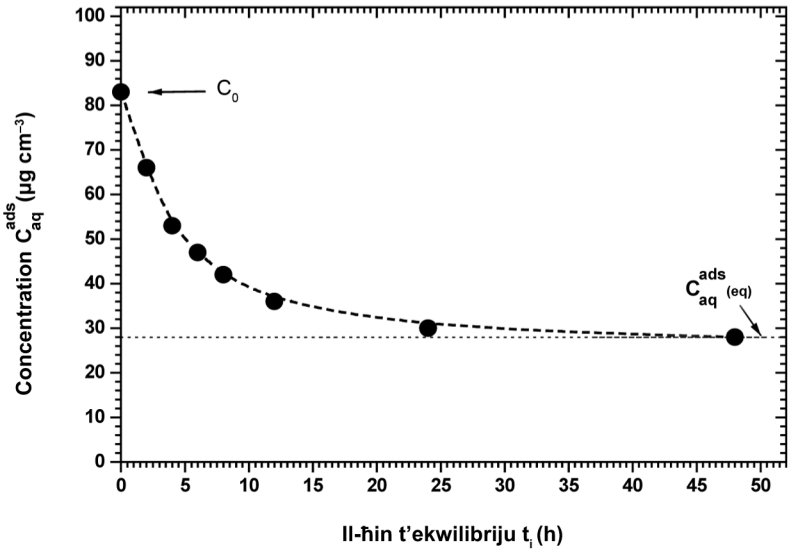


Fig. 2.

Konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza ttestjata fl-aqueous phase (C_{aq}) versu ħin

▼B

(b) *Metodu serial*

L-ekwazzjonijiet li ġejjin jieħdu qies li l-proċedura ta' l-assorbiment hija mwettqa permezz ta' kejl tas-sustanza tat-test f'alikwoti żgħar ta' l-aqueous phase f'intervalli ta' ħin speċifiċi.

— Matul kull intervall ta' ħin l-ammont tas-sustanza assorbita fuq il-ħamrija hija kkalkulata kif ġej:

— għall-ewwel intervall ta' ħin $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— għat-tieni intervall ta' ħin $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— għat-tielet intervall ta' ħin $\Delta t3 = t3 - t2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— għall-nth intervall ta' ħin $\Delta tn = tn - tn - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Il-persentaġġ ta' assorbiment għal kull intervall ta' ħin, $A_{\Delta t_i}$, huwa kkalkulat permezz ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

waqt li l-persentaġġ ta' assorbiment A_{t_i} f' punt tal-ħin$_{ti}$ jingħata b'din l-ekwazzjoni:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Il-valuri ta' l-assorbiment A_{t_i} jew $A_{\Delta t_i}$ (dwar il-bżonnijiet ta' l-istudju) huma pplottjati versu ħin u huwa ddeterminat il-ħin li jittieħed biex jintlaħaq l-ekwilibriju tas-sorption.

— Fil-ħin ta' l-ekwilibriju t_{eq}:

— il-massa tas-sustanza tat-test assorbita fuq il-ħamrija hija:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— il-massa tas-sustanza ttestjata fis-soluzzjoni hija:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— u l-persentaġġ ta' assorbiment waqt ekwilibriju huwa:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Il-parametri użati hawn fuq huma definiti bħala:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massa tas-sustanza assorbita fuq il-ħamrija matul l-intervalli tal-ħin Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} rispettivament (μg);

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = mass of the substance measured in an aliquot v_a^A at thetime points t_1, t_2,t_n respectively (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza assorbita fuq il-ħamrija waqt ekwilibriju ta' l-assorbiment (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza fis-soluzzjoni waqt ekwilibriju ta' l-assorbiment (μg);

v_a^A = volum ta' l-alikwot li fih tiġi mkejla s-sustanza ttestjata (cm^3);

$A_{\Delta ti}$ = persentaġġ ta' assorbiment li jikkorrispondi f'intervall ta' ħin Δt_i (%);

A_{eq} = persentaġġ ta' assorbiment waqt ekwilibriju ta' l-assorbiment (%).

DESORPTION D (%)

Il-ħin t_0 li fih jibda l-esperiment tal-kinetika tad-desorption, huwa kkunsidrat bħala l-mument li l-ikbar ammont ta' volum akkwistat tas-soluzzjoni tas-sustanza tat-test (wara dan jintlaħaq l-assorbiment ta' ekwilibriju) huwa mibdul b'volum ugwali ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$.

(a) *Metodu parallel*

Fil-punt tal-ħin t_i, il-massa tas-sustanza tat-test hija mkejla fl-aqueous phase meħuda mit-tubu i (V_r^i), u l-massa desorbed hija kkalkulata skond din l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Waqt l-ekwilibriju tad-desorption $t_i = t_{eq}$, u għalhekk $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Il-massa tas-sustanza tat-test desorbed matul intervall ta' ħin (At_i) tingħata permezz ta' din l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Il-persentaġġ ta' desorption huwa kkalkulat:

fil-punt tal-ħin t_i mill-ekwazzjoni:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

u matul intervall ta' ħin (Δt_i) mill-ekwazzjoni:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

fejn:

D_{ti} = il-persentaġġ ta' desorption f punt ta' ħin t_i (%);

$D_{\Delta ti}$ = il-persentaġġ ta' desorption li jikkorrispondi ma' intervall ta' ħin At_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = il-massa tas-sustanza tat-test desorbed f punt tal-ħin t_i, (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = il-massa tas-sustanza tat-test desorbed matul intervall ta' ħin At_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = il-massa tas-sustanza tat-test mkejla analitikament fħin t_i fvolum tas-soluzzjoni V_r^i, li jittieħed għall-analiżi (ug);

$m_{aq}{}^{A}$ = il-massa tas-sustanza tat-test li tibqa' mill-ekwilibriju ta' assorbiment dovut għall-bdil tal-volum inkomplet (ug);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = il-massa tas-sustanza tat-test fis-soluzzjoni waqt ekwilibriju ta' assorbiment (μg)

V_R = il-volum tas-supernatant imneħħi mit-tubu wara li jintlaħaq ekwilibriju ta' assorbiment u mibdul bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3);

V_r^i = il-volum tas-soluzzjoni meħuda mit-tubu (i) għall-kejl tas-sustanza tat-test, fl-esperiment tal-kinetika tad-desorption (cm^3).

Il-valuri ta' desorption D_{ti} jew $D_{\Delta t_i}$ (skond il-ħtiġijiet ta' l-istudju) huma pplottjati versu ħin u huwa ddeterminat il-ħin li jittieħed biex jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorption.

(b) *Metodu serial*

L-ekwazzjonijiet li ġejjin jieħdu qies li l-proċedura ta' assorbiment, li kienet ipprekeduta, kienet imwettqa permezz tal-kejl tas-sustanza tat-test f alikwoti żgħar (v_a^A) ta' l-acqueous phase (metodu serial f1.9. Andament tat-test). Huwa meqjus li: (a) il-volum tas-supernatant imneħħi mit-tubu wara l-esperiment ta' l-kinetika ta' l-assorbiment kien mibdul bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ solution (V_R) u (b) u l-volum totali ta' l-aqueous phase fkuntatt mal-ħamrija (V_T)) matul l-esperiment tal-kinetika tad-desorption jibqa' kostanti u jingħata b'din l-ekwazzjoni:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Fpunt tal-ħin t_i:

— il-massa tas-sustanza tat-test hija mkejla falikwot żgħir (v_a^D) u l-massa desorbed hija kkalkulata, skond l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— waqt ekwilibriju ta' desorption $t_i = t_{eq}$ u għalhekk $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— Il-persentaġġ ta' desorption D_{t_i} huwa kkalkulat, mill-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

F'intervall ta' ħin (Δt_i):

Matul kull intervall ta' ħin l-ammont tas-sustanza desorbed huwa kkalkulat kif ġej:

— għall-ewwel intervall ta' ħin $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— għat-tieni intervall ta' ħin $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

u (22)

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— għall-nth intervall $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

u

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Finalment, il-persentaġġ ta' desorption għal kull interval ta' ħin, $D_{\Delta t_i}$, huwa kkalkulat permezz ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

waqt li l-persentaġġ ta' desorption D_{t_i} f'punt tal-ħin t_i jingħata permezz ta' l-ekwazzjoni:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

fejn il-parametri użati hawn fuq huma definiti bħala:

$\dot{m}^{des}_{s}(\Delta t_1)$, $\dot{m}^{des}_{s}(\Delta t_2)$,... , $\dot{m}^{des}_{s}(\Delta t_n)$ = il-massa tas-sustanza li tibqa' assorbita fuq il-ħamrija wara linter-valli tal-ħin Δt_1, Δt_2,..., Δt_nrispetti-vament (μg);

$\dot{m}^{des}_{aq}(\Delta t_1)$, $\dot{m}^{des}_{aq}(\Delta t_2)$,... , $\dot{m}^{des}_{aq}(\Delta t_n)$ = il-massa tas-sustanza tat-test matul l-intervalli tal-ħin rispettivament (μg);

$\dot{m}^{des}_{m}(t_1)$, $\dot{m}^{des}_{m}(t_2)$,... , $\dot{m}^{des}_{m}(t_n)$ = Il-massa tas-sustanza mkejla f'*ali-quot*(v^{D}_{a}) f'punti tal-ħin t_1,t_2,..., t_n, rispettivament (μg)

V_T = il-volum totali ta' l-aqueous phase f'kuntatt mal-ħamrija matul l-esper-iment tal-kinetika tad-desorptione-sekwit bilmetodu serial (cm^3);

m^{A}_{aq} = il-massa tas-sustanza tat-test li jibqa' mill-ekwilibriju ta' lassorbi-ment dovut għall-bdil tal-volum inkomplet (μg)

$$m^{A}_{aq} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^{A}_{a}(i) \right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^{A}_{a}(i)} \right) \cdot m^{ads}_{aq}(eq) \qquad (26)$$

V_R = il-volum tas-supernatant mneħħi mit-tubu wara li jintlaħaq ekwili-briju ta' assorbiment u jinbidel bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3)

v^{D}_{a} = il-volum ta' l-alikwot meħuda bħala kampjun għal skop analitiku mit-tubu (i), matul l-esperiment tal-kinetika tad-desorption mwettaq bil-metodu serial(cm^3);

$$v^{D}_{a} \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

ANNESS 6

ASSORBIMENT-DESORPTION FIL-ĦAMRIJA: KARTI GĦAR-RAPPORT TAD-DATA

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut ta' *dry mass* tal-ħamrija (105 °C,12h): ..... %

it-temperatura: ..... °C

L-adattament tal-metodu analitiku

Il-ħamrija miżunal	g	
Il-ħamrija: *dry mass*	g	
Il-volum $CaCl_2$ sol.	cm^3	
konk.nominali sol.finali	$\mu g\ cm^{-3}$	
Konk. analitiku sol.finali	$\mu g\ cm^{-3}$	

Il-prinċipju tal-metodu analitiku wżat:

Il-kalibrazzjoni tal-metodu analitiku:

Is-susttanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata

Il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija (105 °C, 12 h): ..... %

it-temperatura: ..... °C

Il-metodoloġija analitika ta' wara: Indirett ☐ Parallel ☐ Serjali ☐

Dirett ☐

It-test ta' adżorbzjoni: il-kamjuni għat-test

	Simbolu	Unitajiet	Il-ħint'ekwilib-razzjoni		Il-ħint'ekwilib-razzjoni		Il-ħint'ekwilib-razzjoni		Il-ħint'ekwilib-razzjoni	
In-nru tat-tubu										
Il-ħamrija miżuna	—	g								
Il-ħamrija: *dry mass*	m_{soil}	g								
Il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kalkulat)	V_{WS}	cm^3								
Il-volum 0,01 M $CaCl_2$ sol. Biex jekwilibrizza l-ħamrija		cm^3								
Il-volum ta' *stock solution*		cm^3								
Il-volum totali tal-faża akwea. F'kuntatt mal-ħamrija	V_0	cm^3								
Is-soluzzjoni ta' konċentrazzjoni għat-test inizjali	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Is-sustanza tal-massa għat-test fil-bidu tat-test	m_0	μg								

▼B

	Simbolu	Unitajiet	Il-ħint'ekwilibrazzjoni		Il-ħint'ekwilibrazzjoni		Il-ħint'ekwilibrazzjoni		Il-ħint'ekwilibrazzjoni	
Wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni										
IL-METODU INDIRETT										
Il-metodu parallel										
Il-korrezzjoni tal-fażi akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Il-metodu serjali										
Il-massa tas-sustanzi għat-test imkejla f'*aliquot*[vaA]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
IL-METODU DIRETT										
Il-massa tas-sustanza għat-test adsorbita fil-ħamrija	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Il-kalkolu ta' l-adżorbzjoni										
L-adżorbzjoni	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Il-medji										
Il-koeffiċjent ta' l-adżorbzjoni	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Il-medji										
Il-koeffiċjent ta' l-adżorbzjoni	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Il-medji										

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut ta' *dry mass* tal-ħamrija (105 °C, 12)

it-temperatura: ..... °C

It-test ta' adżorbzjoni: l-imbjanki u l-kontroll

	Simb olu	Unita jiet	Imbjank		Imbjank		l-kontroll	
In-nru tat-tubu								
Il-ħamrija miżuna		g					0	0
L-ammont ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (ikkalkulata)		cm^3					—	—
Il-volum ta' 0,01 M $CaCl_2$ is-soluzzjoni miżjuda		cm^3						
Il-volum ta' l-i*stock solution* tas-sustanza tat-test miżjuda		cm^3	0	0				
It-total tal-volum tal-fażi akwea (ikkalkulata)		cm^3					—	—

▼B

	Simb olu	Unita jiet	Imbjank		Imbjank		l-kontroll	
Il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza għat-test fil-fażi akwea		µg cm^{-3}						
Wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni								
Il-konċentrazzjoni fil-fażi akwea		µg cm^{-3}						

Rimarka: Żid il-kolonni jekk inhumeħtieġ

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija (105 °C 12 s): ..... %

it-temperatura: ..... °C

Il-bilanċ tal-massa

	simbolu	unitajiet				
Nru tat-tubu						
il-ħamrija miżuna	—	g				
Il-ħamrija: *dry mass*	ms_{oil}	g				
il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kkalkulat)	V_{WS}	ml				
il-volum 0,01 M CaCl2 sol, biex tiġi ekwilibrizzata l-ħamrija		ml				
Il-volum ta' *stock solution*		cm^3				
Il-volum totali tal-fażi akwea f'kuntatt mal-ħamrija	V_0	cm^3				
is-soluzzjoni inizjali tat-test tal-konċentrazzjoni	C_0	µg cm^{-3}				
il-ħin ta' ekwilibrazzjoni	—	h				
wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni						
Il-korrezzjoni tal-fażi akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
il-ħin ta' ekwilibrazzjoni t	t_{eq}	h				
l-ewwel *dilution* bis-solvent						
Il-volum imneħħi tal-fażi akwea	V_{rec}	cm^3				
Il-volum miżjud tas-solvent	ΔV	cm^3				
l-ewwel estrazzjoni bis-solvent						
Is-sinjal analizzat fis-solvent	S_{E1}	var.				
konk. Sust. Għat-test. fis-solvent	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	simbolu	unitajiet				
Il-massa tas-sustanza meħuda mill-ħamrija u minn mal-ġnub tar-reċipjent	m_{E1}	µg				
It-tieni *dilution* bis-solvent						
Il-volum imneħħi tas-solvent	ΔV_s	cm^3				
Il-volum miżjud tas-solvent	$\Delta V'$	cm^3				
It-tieni estrazzjoni bis-solvent						
is-sinjal analizzat fil-fażi tas-solvent	S_{E2}	var.				
konk. test subst. in solvent	C_{E2}	µg cm^{-3}				
il-massa tas-sustanza meħuda mill-ħamrija u minn mar-reċipjent	m_{E2}	µg				
Il-massa totali tas-sust. għat-test. meħuda f'żewġ fażijiet	m_E	µg				
il-bilanċ tal-massa	MB	%				

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija(105 °C, 12h): ..... %

it-temperatura: ..... °C

L-adżorbzjoni ta' l-isotermi

	simbolu	unitajiet								
Nru tat-tubu										
il-ħamrija miżuna	—	g								
Il-ħamrija: *dry mass*	E	g								
il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kkalkulat)	V_{WS}	cm^3								
Il-volum 0,01 M $CaCl_2$ sol. Biex tiġi ekwlibrizzata l-ħamrija		cm^3								
Il-volum ta' l-i*stock solution* miżjud		cm^3								
Il-volum totali tal-fażi akwea f'kuntatt mal-ħamrija (calculated)	V_0	cm^3								
Soluzzjoni ta' konċentrazzjoni	C_0	µg cm^{-3}								
il-ħin ta' ekwilibrazzjoni	—	h								

▼B

	simbolu	unitajiet								
wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni										
Il-korrezzjoni tal-faži akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
it-temperatura		°C								
Il-massa ta' ladżorbzjoni kull unità ta' ħamrija	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

L-analiżi ta' rigressjoni:

valur ta' K_F^{ads}:

valur ta' l/n:

il-koeffiċjent tar-rigressjoni r^2:

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija(105 °C, 12 s): ..... %

it-temperatura:..... °C

Il-metodoloġija analitika ta' wara: Indirett ☐ Parallel ☐ Serjali ☐

It-test ta' dežorbzjoni

		simbolu	unitajiet	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni
Nru tat-tubu ġej mill-faži ta' adżorbzjoni							
Il-massa tas-sustanza assorbita fuq il-ħamrija f'ekwilibriju ta' adżorbzjoni		$m_{s}^{ads}(eq)$	µg				
Il-volum tal-faži akwea mneħħija, rimpjazzat minn 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Il-volum totali tal-faži akwea F'kuntatt mal-ħamrija	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Il-massa tas-sustanza għattest imħollija fl-ekwilibriju ta' l-adżorbzjoni minħabba ir-rimpjazzament tal-volum inkomplut		m_{aq}^{A}	µg				
Il-kinetiċi tad-dežorbzjoni							
Il-massa mkejla tas-sustanza disorbita mill ħamrija fil-ħin t_i		$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Il-volum tas-soluzzjoni meħud mit-tubu (i) għal Il-kejl tas-sustanza għat-test	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Il-massa tas-sustanza disorbita mill-ħamrija fil-ħin t_i (ikkalkulat)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Il-massa tas-sustanza disorbita mill-ħamrija il-ħin ta' l-intervall Δt_i (ikkalkulat)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	simbolu	unitajiet	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni
Il-perċentwal tad-dežorbzjoni						
Id-dežorbzjoni fil-ħin t_i	D_{t_i}	%				
Id-dežorbzjoni fl-intervall Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Il-koeffiċjent tad-dežorbzjoni apparenti	K_{des}					

MP: Il-metodu parallel

MS: Il-metodu serjali

▼B

C.19. **ESTIMAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENT TA' ADSORPTION (K_{OC}) FUQ IL-ĦAMRIJA U FUQ ĦAMA TAD-DRENAĠĠ BL-UŻU TA' KROMATOGRAFIJA TA' LIKWIDU LI JIPPERFORMA GĦOLI (HPLC)**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika tal-OECD TG121 (2001).

1.1. DAĦLA

L-aġir ta' sorpzjoni tas-sustanzi fil-ħamrija u fil-ħama tad-drenaġġ jista' jkun deskritt permezz ta' parametri li jkunu determinati b'esperimentar permess tal-metodu tat-testjar C.18. Parametru importanti huwa l-koeffiżjent tal-assorbiment li huwa mfisser bħala r-ratio bejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-ħamrija/ħama u l-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-fażi akwatika fuq l-ekwilibriju tal-assorbiment. Il-koeffiċjent tal-assorbiment normalizzat għall-kontenut karboniku organiku fil-ħamrija K_{oc} huwa indikatur utili għall-kapaċita vinkolanti ta' kimika fuq materja organika tal-ħamrija jew ħama tad-drenaġġ u jippermetti li wieħed jikkompara bejn kimiċi differenti. Dan il-parametru jista' jkun estimat minn korrelazzjonijiet mas-solubilita fl-ilma u in- n-octanol/koeffiċjenta' diviżjoni ta' l-ilma (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Il-metodu ta' esperimentar deskritt f'dan it-test juża' l-HPLC għall-estimu tal-koeffiċjent tal-assorbiment K_{oc} fil-ħamrija u fil-ħama tad-drenaġġ (8). L-estimi huma aktar ta' min wieħed jafdahom minn dawk tal-kalkolazzjoni QSAR (9). Bħala metodu ta' stima ma tistax tieħu post kompletament il-lott ta' esperimenti ta' ekwilibriju użati fil-metodu ta' test C18. Madankollu, il-K_{oc} estimata tista' tkun utili meta tiġI biex tagħżel paramentri ta' testijiet xierqa għal studji ta' assorbiment/desorpzjoni skond il-metodu ta' test C.18 billi tikkalkula l-K_d (koeffiċjent ta' distribuzzjoni) jew K_f (Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich) skond l-equation 3 (ara taqsima 1.2).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

K_d: Il-koeffiċjenti ta' distribuzzjoni huwa deskritt bħala r-ratio tal-konċentrazzjonijiet ta' ekwilibriju C ta' test fuq sustanza li kien imdewweb permezz ta' sistema ta' żewġ fażijiet li tikkonsisti f'sorbent (ħamrija jew ħama tad-drenaġġ) u fażi akwatika; hija valur mingħajr dimensjoni fejn konċentrazzjonijiet fiż-żewġ fażi huma espressi skond bażi ta' piż/piż. Fil-każ illi l-konċentrazzjoni fil-fażi akwatika hija mogħtija bħala bażi ta' piż/volum, hemmhekk il-units huma ml· g^{-1}. K_d tista' tvarja skond il-kwalitajiet ta' sorbent u tista' tkun dipendenti fuq is-solubilità.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{slud}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

meta:

C_{soil} = konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-ħamrija f ekwilibriju (μg· g^{1})

C_{slud} = konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-ħama f ekwilibriju (μg· g^{1})

C_{aq} = konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-fażi akwatika fekwilibriju (μg· g^{-1}, μg· ml^{-1}).

▼B

K_f: Il-Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-ħamrija jew ħama tad-drenaġġ (x/m) meta l-konċentrazzjoni tal-ekwilibriju C_{aq} fil-fażi akwatika hija ugwali għall-wieħed; units huma $ng.g^{1}$ sorbent. Il-valur jista' jvarja skond il-kwalitajiet tas-sorbent.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

fejn:

x/m = ammont ta' sustanza taħt prova x (μg) assorbiti f ammont ta' sorbent m (g) f'ekwilibriju

1/n = niżla ta' isoterm ta' assorbiment ta' Freundlich

C_{aq} = konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-fażi akwatika f 'ekwilibriju ($\mu g \cdot ml^{-1}$)

$AtC_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{oc}: Distribution coefficient (K_d) jew Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich (K_f) normalizzat għall-kontenut ta' carbon organiku (f_{oc}) ta' sorbent; partikolarment għall-kimiċi li mhumiex ionizzata, huwa indikazzjoni approssimattiva għall-estent ta' assorbiment bejn is-sustanza u s-sorbent u jaċċetta li wieħed ikun jista' jikkompara bejn kimiċi different. Skond id-dimensjoni ta' K_d u K_f, K_{oc} tista' tkun mingħajr dimensjoni jew ikollha l-units $ml \cdot g^{1}$ jew $\mu g.g^{1}$ materja organika.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\left(\text{dimensionless or } ml \cdot g^{-1}\right) \text{or} \frac{Kf}{foc}\left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Ir-relazzjoni bejn K_{oc} u K_d mhijiex dejjem lineari u għalhekk valuri ta' K_{oc} jistgħu jvarjaw minn ħamrija għall-ħamrija imma l-varjabilita' tista' tkun ridotta drastikament meta kkomparata ma' valuri K_d jew K_f.

Il-Koeffiċjent ta' assorbiment (Koc) huwa mnaqqas mill-fattur ta' kapacita' (k') bl-użu ta' plot ta' kalibrazzjoni ta' log k' kontra log K_{oc} tat-taħlita magħżula bħala riferenza.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

fejn:

t_R = HPLC ħin ta' ritenzjoni tat-test u sustanza ta' riferenza (minuti)

t_0 = HPLC ħin mejjet (minuti) (ara taqsima 1.8.2).

P_{OW}: Il-koeffiċjenti tad-diviżjoni ta' octanol-ilma huwa deskritt bżala r-ratio tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza mdewba f'n-octanol u ilma; huwa valur mingħajr dimensjoni.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq} (= Kow) \quad (5)$$

1.3. SUSTANZI TA' RIFERENZA

Il-formula ta' struttura, il-purita' u l-konstant tad-dissoċjazzjoni (jekk mixtieqa) għandha tkun magħrufa qabel jintuża dan il-metodu. Informazzjoni dwar is-solubilita' fl-ilma u f'solventi organiċi, f'diviżjoni ta' koeffiċjenza ta' octanol-ilma u l-karatteristiċi ta' hydrolysis huma utili.

▼B

Sabiex tirrelata d-data ta' retezjoni tal-HPLC kif imkejla ta' sustanza taħt test bil-koeffiċjenti tal-assorbiment tagħha, graff ta' kalibrazzjoni ta' log K_{oc} kontra log k' għandha tkun stabbilita. Minimu ta' sitt punti ta' riferenza, mill-inqas wieħed 'il fuq u wieħed l-isfel mill-valur pretiż tas-sustanza taħt prova għandhom ikunu użati. Ir-reqqa tal-metodu jkun aktar mtejjeb sinjifikament jekk ikunu wżati sustanzi ta' riferenza li huma relatati strutturalment mas-sustanza taħt prova. Jekk din id-data mhijiex disponibbli, sta għall-utent illi jagħżel s-sustanzi ta' kalibrazzjoni xierqa. Sett aktar ġenerali ta' sustanzi strutturalment eteroġeniċi għandhom ikunu mgħażula f'dan il-każ. Sustanzi u valuri ta' K_{oc} li jistgħu jkunu użati huma mniżżla fl-Anness f'Tabella 1 għall-ħama ta' drenaġġ u f'Tabella 3 għall-ħamrija. L-għażla ta' sustanzi oħra ta' kalibrazzjoni għandha tkunu ġustifikati.

1.4. PRINĊIPJITAL-METODU TA' PROVA

HPLC huwa magħmul fuq kolonni analitiċI ippakkjati b'faži solida ta' cyanopropyl disponibbli kummerċjalment li fih jinstabu biċċiet ta' ipofiliċi u polari. Faži stazzjonarja li hi moderalment polari bbażata fuq matrix ta' silica hija użata:

– O – Si	– CH_2 – CH_2 – CH_2	– CN
silica	non-polar spacer	polar moiety

Il-prinċipju tal-metodu ta' prova huwa simili għall-metodu ta' testjar A.8 (koeffiċjent ta' diviżjoni, metodu HPLC). Waqt li tgħaddi mill-kolonna flimkien mall-faži mobbli, is-sustanza taħt prova għandha effett mall-faži stazzjonarja. Bħala riżultat diviżjoni o bejn faživijiet mobbli u stazzjonarjiu s-sustanza taħt prova hija mdewwma. Iż-żewġ komposizzjonijiet tal-faži stazzjonarja li għandhom sites polari u mhux polari jaċċettaw effett ma' gruppi polari u mhux polari ta' molekuli simili bħal fil-każ ta' materji organiċi f'matrices fil-ħamrija jew fi ħama tad-drenaġġ. Dan jagħmel possibbli r-relazzjoni bejn il-ħin ta' ritenzjoni fil-kolonna u l-koeffiċjent ta' assorbiment f'materji organiċi li jista' jkun stabbilit.

pH għandu influwenza sinjifikattiva fuq l-atteġġjament ta' sorpzjoni partikolarment f'sustanzi polari. Għall-ħamrija agrikola jew tankijiet ta' impjanti ta' trattament ta' drenaġġ il-pH normalment tvarja bejn pH 5,5 u 7,5. Għal sustanzi ionizzabbli, żewġ testijiet għandhom ikunu magħmula b' formi kemm ionizzati u kemm mhux ionizzati f'soluzzjonijiet ta' buffer xierqa, imma dan biss f'każijiet fejn mill-inqas 10 % tal-kompost taħt prova jkun dissoċjati bejn pH 5,5 u s-7,5.

Billi r-relazzjoni biss bejn ir-ritenzjoni fuq il-kolonna ta' HPLC u l-koeffiċjent ta' adżorbzjoni huwa użat għall-evalwazzjoni, mhux rikjest li jkun hemm il-metodu ta' analizzar kwantitattiv u jkun biss neċessarju d-determinazzjoni tal-ħin ta' retention. Jekk ikun disponibbli sett ta' sustanzi ta' riferenza u jkunu jistgħu jiġu wżati kondizzjonijiet standard ta' esperimentar, il-metodu jipprovdi mezz aktar mgħaġġla u effiċjenti sabiex ikun hemm estimu tal-koeffiċjent K_{oc} ta' assorbiment.

1.5. APPLIKABBILITÀ TAT-TEST

Il-metodu HPLC huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi (kemm jekk mingħajr tikketta u jekk bit-tikketta) għal xhiex sistema ta' skoperta xierqa (eż. spectrofotometer, ta' radjoattività) hija disponibbli u li huma suffiċjentament stabbli waqt il-lant tal-esperiment. Jista' jkun partikolarment bżonnjuż għall-kimiċi li huma diffiċli illi jkunu studjati f'sistemi oħra ta' esperimentar (i.e. sustanzi volatili; substanzi li ma jinħallux fl-ilma f'konċentrazzjoni illi tista' tiġi mkejla analitikament; substanzi li għandhom affinita qawwija għas-surface tas-sistemi ta' inkubazzjoni). Il-metodu jista' jkun użat għat-taħlit illi jagħtu elution bands mhux risolti. F'każijiet bħal dawn, limiti 'l fuq u 'l isfel tal-valuri tal-log Koc tal-kompost tat-taħlit taħt prova għandhom ikunu magħrufa.

▼B

Xi kultant impuritajiet jistgħu jikkawżaw problemi fl-interpretazzjoni tar-riżultati tal-HPLC, imma dawn huma ta' imprtanza minuri kemm-il darba s-sustanza taħt prova tista' analitikament tkun identifikabbli kjarament u sseparata mill-impuritajiet.

Il-metodu huwa validat għal sustanzi mniżżla f'Tabella 1 fl-Anness u kien ukoll applikat għal varjeta ta' kimiċi oħra li jagħmlu parti mill-klassijiet ta' kimiċi kif ġejjin:

— amines aromatiċi (eż trifluralin, 4-chloroaniline, 3,5-dinitroaniline, 4-methylaniline, N-methylaniline, 1-naphthylamine),

— *carboxilic acid esters aromatic* (eżbenzoic acid methylester, 3,5-dinitrobenzoic acid ethylester),

— hydrocarbons aromatiċi (eż toluene, xylene, ethylbenzene, nitrobenzene),

— aryloxyphenoxypropionic acid esters (eż *diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl*, *fenoxaprop-P-ethyl*),

— *benzimidazole* u *imidazole fungicides* (eż *carbendazim, fuberidazole*, *triazoxide*),

— *carboxilic acid amides* (eż 2-*chlorobenzamide, N,N-dimethylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-methylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide*),

— *chlorinated hydrocarbons* (eż *endosulfan, DDT, hexachlorobenzene, quintozene, 1,2,3-trichlorobenzene),*

— *organophosphorus insecticides* (eż *azinphos-methyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos*),

— *phenols* (eż *phenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, pentachlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, 1-naphthol*),

— *phenylurea derivatives* (eż. *isoproturon, monolinuron, pencycuron*),

— *pigment dyestuffs* (eż *acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81*),

— *polyaromatic hydrocarbons* (eż *acenaphthene, naphthalene*),

— *1,3,5-triazine herbicides* (eż *prometryn, propazine, simazine, terbutryn*),

— *triazole derivatives* (eż *tebuconazole, triadimefon, tradimenol, triapenthenol*).

Il-metodu mhuwiex applikabbli għal sustanzi li jagħmlu reazzjoni jew mall-eluent jew mall-faži stazzjonarja. Mhuwiex applikabbli wkoll għal sustanzi illi jagħmlu reazzjoni b'mod speċifiku ma' taħlit inorganiku (eż formażżjoni ta' gzuz kumplessi ma' minerali taċ-ċaqquf). Il-metodu jista' ma jaħdimx għal sustanzi attivi li jitilgħu fil-wiċċ, kompost inorganiku u aċidi jew bażijiet moderati jew b'saħħithom. Valuri ta' Log K_{oc} bejn il-1,5 sal-5,0 jistgħu jiġu ddeterminati. Sustanzi inonissabbli għandhom ikunu mkejla permezz ta' l-użu ta' faži mmobbli buffered, imma wie'ed għandu jieħu ħsieb illi jevita l-preċipitazzjoni ta' komponimenti ta' buffer jew sustanza taħt prova.

▼B

1.6. KRITERJA TA' KWALITÀ'

1.6.1. **Akkuratezza**

Normalment, il-koeffiċjent ta' assorbiment ta' sustanza taħt prova jkun estimat bejn il-± 0,5 unit ta' log tal-valur determinat bil-metodu tal-ekwilibrju tal-grupp (ara Tabella 1 fl-Anness). Akkuratezza ogħla tista' tiġi milħuqa jekk is-sustanza ta' riferenza użata hija strutturalment relatata mas-sustanza taħt prova.

1.6.2. **Ir-rata tar-repetizzjoni**

Determinazzjonijiet għandhom isiru mill-inqas f'darbtejn. Il-valuri ta' log K_{oc} meħuda mill-kejl individwali għandu jkun bejn il-unit ta' 0,25 log.

1.6.3. **Riproduċibbilità**

Esperjenza milħuqa sa issa fl-applikazzjoni tal-metodu hija ta' sosten għall-validita' tagħha. Investigazzjoni tal-metodu ta' HPLC, bl-użu ta' 48 sustanza (l-aktar minnhom pestiċidi) għal liema kien hemm diġa disponibbli data dwar K_{oc} ta' min wieħed joqgħod fuqha tal-koeffiċjent ta' korrelazzjoni ta' R = 0,95 (10) (11).

Test ta' komparazzjoni magħmul f'laboratorju bil-parteċipazzjoni ta' 11-il laboratorju ġie magħmul sabiex jirranġa u jivvalida il-metodu (12). Ir-riżultati huma mogħtija f'Tabella 2 fl-Anness.

1.7. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' PROVA

1.7.1. **Estimazzjoni preliminari tal-koeffiċjent ta' assorbiment**

Il-koeffiċjent P_{ow} (= K_{ow}) ta' diviżjoni ta' octanol-ilma u sa ċertu punt, is-solubilita fl-ilma jistgħu jintużaw bħala indikaturi ai fini tal-assorbiment, partikolarment għal sustanzi li mhumiex ionizzati, u għalhekk jistgħu jintużaw sabiex jinstab il-limitu preliminari. Varjeta' ta korrelazzjonijiet bżonnjużi ġew ippubblikati għall-diversi gruppi ta' kimiċi (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Apparat**

Kromatograf likwidu, li miegħu ġie mwaħħal pompa pulse-free u mekkaniżmu xieraq ta' detection huwa meħtieġ. L-użu ta' valv ta' injezzjoni b'loop ta' injezzjoni huwa rikkmandat. Resins magħmula minn kimiċu ta' cyanopropyl magħquda kommerċjalment fuq bażi ta' silica għandhom ikunu użati (eż Hypersil u Zorbax CN). Kolonna ta' gwida ta' l-istess materjal tista' tkun impoġġija bejn is-sistema ta' injezzjoni u l-kolonna analitika. Kolonni minn fornituri differenti jistgħu jvarjaw konsiderevolment fl-effiċjenza tas-separazzjoni tagħhom. Bħala gwida, il-fatturi ta' kapaċita k' li ġejjin għandhom ikunu milħuqa: log k' > 0,0 għal log K_{oc} = 3,0 u log k' > 0,4 għal log K_{oc} = 2,0 meta tuza methanol/ilma 55/45 % bħala fażi mobbli.

1.7.3. **Fażijiet mobbli**

Diversi ġew ittestjati, u it-tnejn li ġejjin huma rrikmandati:

— methanol/ilma (55/45 % v/v),

— methanol/0,01M citrate-buffer pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

HPLC grade methanol u ilma distillat jew citrate buffer huma użati sabiex jiġi ppreparat is-solvent ta' elutar. It-taħlita hija iddigassjata qabel ma tiġi użata. Eluzzjoni isokratika għandha tkun użata. Jekk taħlit ta' methanol/ilma mhuwiex ritenut xieraq, taħlit organiku ieħor ta' other solvent/ilma jista' jiġi ppruvat, eż. ethanol/ilma jew taħlita ta' acetonitrile/ilma. Għal kompost ionizzabbli, l-użu ta' soluzzjoni ta' buffer hija rrikmandata sabiex tkun stabilizzata l-pH. Wieħed għandu jieħu ħsieb illi tkun evitata preċipitazzjoni ta' melħ u deterjorazzjoni ta' kolonni, li jista' jiġri waqt it-taħlit ta' xi phase/buffer organiċi.

L-ebda addittiv bħal reagents ta' ion pair jistgħu jiġu użati minħabba li dawn jistgħu jaffetwaw il-kwalifiki ta' sorpzjoni tal-faži stazzjonarja. Dawn il-kambjamenti fil-faži stazzjonarja jistgħu jkunu irriversibbli Għal din ir-raġuni, huwa obbligatorju illi esperimenti li fihom jintużaw addittivi għandhom isiru f'kolonni separati.

1.7.4. **Solutes**

Sustanzi taħt prova u ta' riferenza għandhom ikunu maħlulin fil-faži mobbli.

1.8. PRESTAZZJONI TAT-TEST

1.8.1. **Il-kondizzjoni tat-test**

Waqt il-kejl it-temperatura għandha tkun irrekordjata. L-użu ta' kompartament ta' kolonna hija rrikmandata ħafna sabiex tiggarantixxi kondizzjonijiet stabbli waqt il-kalibrazzjoni u r-runs ta' estimi u kejl tas-sustanza taħt prova.

1.8.2. **Determinazzjoni dead time to**

Għad-determinazzjoni tal-dead time għaż-żewġ metodi differenti jistgħu jiġu użati (ara wkoll taqsima 1.2).

1.8.2.1. *Determinazzjoni ta' ħin mejjet permezz ta' serje omologi*

Din il-proċedura wriet illi tagħti valuri ta' min wieħed joqgħod fuqhom u li huma standard. Għad-detallji ara l-metodu tat-testjar A.8: koeffiċjent ta' diviżjoni (n-octanol/ilma), metodu HPLC.

1.8.2.2. *Determinazzjoni ta' ħin mejjet permezz ta' sustanzi inert li mhumiex miżmuma mill-kolonna*

Dan il-metodu ta' teknika huwa bbażat fuq injezzjoni ta' soluzzjonijiet ta' formamide, urea u nitrat tal-kubrit. Il-kejl irid ikun magħmul mill-inqas darbtejn.

1.8.3. **Determinazzjoni tad-drabi tar-ritenzjoni tR**

Sustanzi ta' riferenza għandhom ikunu magħżula kif deskritt f'taqsima 1.3. Jistgħu jkunu injettati bħala taħlita standard sabiex ikun stabbilit id-drabi tagħhom tar-ritenzjoni, kemm-il darba jkun ikkonfermat illi l-ħin ta' ritenzjoni ta' kull standard ta' riferenza ma jkunx affetwat bil-preżenza ta; standards oħra ta' riferenza. Il-kalibrazzjoni għandha tkun magħmula f'intervalli regolari mill-inqas darbtejn kuljum sabiex jieħdu konsiderazzjoni ta' xi kambjamenti mhux maħsuba fil-kolonna tal-prestazzjoni. Għall-aħjar prattika, l-injezzjonijiet ta' kalibrazzjoni għandhom ikunu magħmula qabel u wara l-injezzjonijiet tas-sustanza taħt prova sabiex ikun ikkonfermat illi l-ħin ta' ritenzjoni ma kienx injorat. Is-sustanzi taħt prova huma injettati separatament fi kwantitajiet kemm jista' jkun żgħar (sabiex jevitaw overload ta' kolonni) u l-ħinijiet tagħhom ta' ritenzjoni jkunu determinati.

▼B

Sabiex tiżdied il-kunfidenza fil-kejl, mill-inqas żewġ determinazzjonijiet għandhom ikunu magħmula. Il-valuri ta' log K_{oc} miġjuba mill-kejl individwali għandhom ikunu bejn il-0,25 log unit.

1.8.4. **Evalwazzjoni**

Il-fatturi ta' kapaċita' k' huma kkalkolati mill-ħin mejjet t_o u sal-ħinijiet ta' ritenzjoni t_R tas-sustanzi tar-referenza kif magħżula skond l-equation 4 (ara taqsima 1.2). Id-*data* tal-log k' tas-sustanzi ta' referenza huma mbagħad ipplottjati kontra il-valuri tal-log K_{oc} tagħhom mill-esperimenti ta' ekwilibriju fil-gruppi mogħtija f'Tabelli 1 u 3 tal-Anness. Bl-użu ta' dan il-plot, il-valur ta' log k' tas-sustanza taħt prova hija mbagħad użata sabiex ikun jista' jiġi stabbilit il-valur ta' log K_{oc} tagħha. Jekk ir-riżultati attwali juru illi l-log Koc tas-sustanzi taħt prova hija barra l-limitu ta' kalibrazzjoni, it-test għandhu jerġa jiġi magħmul bl-użu ta' sustanzi differenti, aktar xierqa.

2. **DATA U RRAPURTAR**

Ir-rapport għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— identita' tas-sustanzi taħt prova u bħala riferenza u l-purita tagħhom, u l-valuri pK_a jekk rilevanti,

— deskrizzjoni ta' apparat u kondizzjonijiet tal-operat eż. tip u dimensjoni tal-kolonna analitika (u gwida), il-metodu ta' identifikar, fażi mobbli (ratio ta' komponimenti u pH), il-limiti ta' temperatura waqt il-kejl,

— ħin mejjet u l-metodu użat sabiex ikun determinat,

— kwantitajiet ta' sustanzi taħt prova u bħala riferenza introdotti fil-kolonna,

— ħinijiet ta' ritenzjoni tal-kompost ta' riferenza użat għall-kalibrazzjoni,

— dettalji tal-linja ta' rigressjoni kif mdaħħla (log k' vs log K_{oc}) u l-graff tal-linja ta' rigressjoni,

— medja tad-*data* ta' ritenzjoni u l-valur ta' d log K_{oc} estimat għall-kompost taħt prova.

— chromatograms.

3. **REFERENZI**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adżorbzjoni coefficient (Koc) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adżorbzjoni, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pġ. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic between soil organic matter and water. Sci. Technol., 17, pġ. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic, Science, 106, pġ. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pġ. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pġ. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adżorbzjoni coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pġ. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pġ. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pġ. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient on soil-results of a ring. Chemosphere, 30(7), pġ. 1373-1384.

▼B

ANNESS

Tabella 1

Komparazzjoni ta' valuri ta' Koc għall-ħamrija u ħama tad-drenaġġ, u valuri ikkalkolati bil-metodu tal-iscreening tal-HPLC ([1]), ([2])

Sustanza	CAS Nr.	Log Koc drenaġ ġ ħama	log Koc HPL C	Δ	log Koc ħamri ja	log Koc HPL C	Δ
Atrazine	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phenanthrene	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoic acid phenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 – 128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adżorbzjoni-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

Tabella 2

Riżultati ta' testijiet inter-komparabbli f'laboratorji (11 –il laboratorju parteċipanti) magħmula sabiex jagħmlu aħjar u jivvalidaw il-metodu ta' HPLC ([1])

Sustanza	CAS Nr.	log K_{oc}	$K_{oc\ log}$	K_{oc}
		[OECD 106]	[Metodu HPLC]	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

▼B

Tabella 3

Sustanzi ta' riferenza rrikomandati għall-metodu tal-iscreening tal-HPLC ibbażat fuq id-data ta' assorbiment tal-ħamrija

Sustanza ta' riferenza	CAS Nr.	Log K_{oc} mean valuri minn grupp ekwilibriju	Numru ta' data ta' K_{oc}	log S.D.	Eġħun
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Phenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N.N-dimethylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Methylbenzamide	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Methylbenzoate	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazine	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamide	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naphthalene	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Trichlorobenzene	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Phenanthrene	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
(c) Id-*data* provduta mill-industrija.

▼M7

C.20. TEST TAR-RIPRODUZZJONI DAPHNIA MAGNA

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 211 tal-OECD (2012). Il-linji gwida tat-test tal-OECD jiġu riveduti perjodikament fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-linja gwida tat-test 211 dwar ir-riproduzzjoni toriġina mil-linja gwida tat-test 202, Parti II, *Daphnia* sp. reproduction test (1984). Ġeneralment kien rikonoxxut li dejta minn testijiet li jsiru skont dik it-TG 202 tista' tvarja. Dan wassal għal sforz konsiderevoli ddedikat għall-identifikazzjoni tar-raġunijiet għal din il-varjabbiltà bil-għan li jiġi prodott metodu ta' ttestjar aħjar. Il-linja gwida tat-test 211 hija msejsa fuq l-eżitu ta' dawn l-attivitajiet ta' riċerka, ringtests u studji ta' validazzjoni mwettqin fl-1992 (1), l-1994 (2) u l-2008 (3).

Id-differenzi ewlenin bejn il-verżjoni inizjali (TG 202, 1984), u t-tieni verżjoni (TG 211, 1998) tal-linja gwida tat-test dwar ir-riproduzzjoni huma:

— l-ispeċijiet rakkomandati sabiex jintużaw fid-*Daphnia magna*;

— id-durata tat-test hija ta' 21 jum.

— għal testijiet semistatiċi, in-numru ta' annimali li sejrin jintużaw f'kull konċentrazzjoni tat-test tnaqqas minn tal-inqas 40, idealment maqsumin f'erba' gruppi ta' 10 annimali, għal tal-inqas 10 annimali miżmumin għalihom (għad li jistgħu jintużaw disinni differenti għal testijiet bi fluss kontinwu);

— saru rakkomandazzjonijiet iktar speċifiċi fir-rigward tal-medium tat-test u l-kundizzjonijiet tat-tagħlif.

— id-differenzi ewlenin bejn it-tieni verżjoni tal-linja gwida tat-test dwar ir-riproduzzjoni (TG 211, 1998), u din il-verżjoni huma:

— żdied l-Appendiċi 7 sabiex jiġu deskritti l-proċeduri għall-identifikazzjoni tas-sess tal-wild, jekk ikun hemm bżonn. B'konformità mal-verżjonijiet ta' qabel ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-proporzjon tas-sess huwa punt ta' tmiem fakultattiv;

— in-numru tal-varjabbli tar-rispons ta' nisel li jgħix prodott għal kull annimal ġenitur li jibqa' ħaj ġie ssupplimentat minn varjabbli tar-rispons addizzjonali għar-riproduzzjoni ta' *Daphnia*, jiġifieri n-numru totali ta' nisel ħaj prodott fi tmiem it-tst għal kull daphnia ġenitur fil-bidu tat-test, eskluż mill-analiżi tal-mortalità aċċidentali u/jew mhux intenzjonata tal-ġenituri. L-iskop tal-varjabbli tar-rispons miżjud huwa li dan il-varjabbli tar-rispons jiġi allinjat ma' metodi ta' ttestjar tar-riproduzzjoni oħrajn fuq l-invertebrati. Barra minn hekk, b'rabta ma' dan il-varjabbli tar-rispons, f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa possibbli li jitneħħa sors ta' żball, jiġifieri l-effett ta' mortalità mhux intenzjonata u/jew aċċidentali tal-ġenituri, jekk iseħħ matul il-perjodu ta' esponiment.

— gwida statistika addizzjonali għad-disinn tat-test u għat-trattament tar-riżultati ġiet inkluża kemm għall-EC_x (eż. EC10 jew EC50) kif ukoll għall-approċċ NOEC/LOEC.

— huwa introdott test tal-limitu.

Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

L-għan primarju tat-test huwa li jiġi vvalutat l-effett tal-kimiku fuq ir-riżultat riproduttiv tad-*Daphnia magna*. Għal dan il-għan, *Daphnia* femminili żgħar (l-annimali ġenituri), li jkollhom inqas minn 24 siegħa fil-bidu tat-test, jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test miżjuda mal-ilma f'medda ta' konċentrazzjonijiet. Id-durata tat-test hija ta' 21 jum. Fi tmiem it-test jiġi vvalutat in-numru totali ta' nisel ħaj prodott. Ir-riżultat riproduttiv tal-annimali ġenituri jista' jkun espress permezz ta' modi oħrajn (eż. numru ta' nisel ħaj prodott minn kull annimal kull jum mill-ewwel ġurnata li fih beda jiġi osservat in-nisel) iżda dan għandu jiġi rrapportat minbarra n-nisel ħaj prodott fi tmiem it-test. Minħabba d-disinn partikolari tat-test semistatiku meta mqabbel ma' metodi ta' ttestjar oħrajn tar-riproduzzjoni tal-invertebrati, huwa possibbli wkoll li jingħadd in-numru ta' nisel ħaj

▼M7

prodott minn kull annimal ġenitur individwali. Dan jippermetti sabiex, għall-kuntrarju ta' metodi oħrajn ta' ttestjar tar-riproduzzjoni fl-invertebrati, jekk l-annimal ġenitur imut b'mod aċċidentali u/jew b'mod mhux intenzjonat, il-produzzjoni ta' nisel tiegħu tista' tiġi eskluża mill-valutazzjoni tad-dejta. B'hekk, jekk isseħħ mortalità tal-ġenituri f'repliki esposti, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-mortalità ssegwix mudell ta' rispons għall-konċentrazzjoni, eż. jekk hemmx rigressjoni sinifikanti tar-rispons kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test b'pendil pożittiv (għal dan jista' jintuża test statistiku bħat-test tat-tendenza ta' Cochran-Armitage). Jekk il-mortalità ma ssegwix xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, dawk ir-repliki b'mortalità tal-ġenituri għandhom jiġu esklużi mill-analiżi tar-riżultat tat-test. Jekk il-mortalità ssegwi xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, il-mortalità tal-ġenituri għandha tiġi assenjata bħala effett tas-sustanza kimika tat-test u r-repliki ma għandhomx jiġu esklużi mill-analiżi. Jekk l-annimal ġenitur imut matul it-test, jiġifieri aċċidentalment minħabba mmaniġġjar ħażin jew aċċident, jew b'mod mhux intenzjonat minħabba l-inċident mhux spjegat mhux marbut mal-effett tas-sustanza kimika tat-test jew jirriżulta li huwa raġel, ir-replika tiġi eskluża mill-analiżi (ara iktar fil-paragrafu 51). L-effett tossiku tas-sustanza kimika tat-test fuq l-eżitu riproduttiv jingħata bħala EC_x billi d-dejta titqiegħed f'mudell xieraq permezz ta' rigressjoni mhux lineari sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkaġuna tnaqqis ta' x % fl-eżitu riproduttiv, rispettivament, jew inkella bħala l-valur NOEC/LOEC (4). *Idealment, il-konċentrazzjonijiet tat-test jiġbru l-inqas mill-konċentrazzjonijiet tal-effett użati (eż. EC_{10}) xi ħaġa li tfisser li dan il-valur huwa kkalkolat b'interpolazzjoni u mhux estrapolazzjoni.*

Is-sopravvivenza tal-annimali ġenituri u ż-żmien sal-produzzjoni tal-ewwel ħut riproduttur għandu jkun irrapportat ukoll. Effetti oħrajn marbutin mas-sustanza kimika fuq parametri bħat-tkabbir (eż. it-tul), u r-rata possibilment intrinsika taż-żieda fil-popolazzjoni, jistgħu jiġu eżaminati wkoll (ara l-paragrafu 44).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

Ir-riżultati ta' test tat-tossiċità akuta (ara l-kapitolu C.2 ta' dan l-Anness: Test tal-immobilizzazzjoni akuta ta' *Daphnia* sp.) imwettaq b'*Daphnia* magna jista' jkun utli fl-għażla ta' medda xierqa ta' konċentrazzjonijiet tat-test fit-testijiet tar-riproduzzjoni. Is-solubilita fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test għandhom ikunu magħrufin u għandu jkun hemm disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fis-soluzzjonijiet tat-test b'effiċjenza ta' rkupru rraportata u l-limitu ta' determinazzjoni.

Informazzjoni fuq is-sustanza kimika tat-test, li tista' tkun siewja sabiex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test, tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza kimika, l-istabilità fil-kundizzjonijiet tat-test, il-pKa, P_{OW} u riżultati ta' test għall-bijodegradabilità faċli (ara l-kapitoli C.4 (determinazzjoni ta' bijo-degradabilità "faċli") u C.29 (bijodegradabilità faċli — CO_2 f'reċipjenti ssiġillati) ta' dan l-Anness).

VALIDITÀ TAT-TEST

Sabiex test ikun validu, dawn il-kriterji ta' eżekuzzjoni li ġejjin, għandhom ikunu ssodisfati fil-kontroll(i):

— il-mortalità tal-annimali ġenituri (*Daphnia* femminili) ma taqbiżx l-20 % fi tmiem it-test;

— in-numru medju ta' nisel ħaj prodott għal kull annimal ġenitur li jibqa' ħaj fi tmiem it-test huwa ta' > 60.

Nota: Jista' jintuża l-istess kriterju ta' validità (20 %) għal mortalità aċċidentali u mhux intenzjonata tal-ġenituri għall-kontrolli kif ukoll għal kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test.

▼M7

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

Ir-reċipjenti tat-test u apparat ieħor li sejrin jiġu f'kuntatt mas-soluzzjonijiet tat-test għandhom ikunu magħmula kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. Normalment ir-reċipjenti tat-test ikunu bekkijiet tal-ħġieġ.

Barra minnn hekk, huma meħtieġa wħud jew kull wieħed mill-apparati ta' hawn taħt:

— ossiġenometru (b'mikroelettrodu jew apparat xieraq ieħor għall-kejl tal-ossiġenu dissolt f'kampjuni ta' volum baxx);

— apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— miter tal-pH;

— apparat għad-determinazzjoni tal-ebusija tal-ilma;

— apparat għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' karbonju organiku totali (TOC) tal-ilma jew apparat għad-determinazzjoni tad-domanda kimika ta' ossiġenu (COD),

— apparat adegwat għall-kontroll tar-reġim tad-dawl u l-kejl tal-intesita' tad-dawl.

Organiżmu tat-Test

L-ispeċi li għandha tintuża fit-test hija *Daphnia magna* Straus ([1]).

Idealment, il-klonu għandu jkun ġie identifikat bil-ġenotipar. Riċerka (1) uriet li l-prestazzjoni riproduttiva tal-Klonu A (li oriġina minn IRCHA fi Franza) (5) konsistentament laħaq il-kriterju ta' validità ta' medja ta' ≥ 60 nisel ħaj kull annimal ġenitur li jkun baqa' ħaj meta kkulturati fil-kundizzjonijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, kloni oħrajn jistgħu jiġu aċċettati diment li jintwera li l-kultura tad-*Daphnia* tilħaq il-kriterji ta' validità għat-test.

Fil-bidu tat-test, l-annimali għandu jkollhom inqas minn 24 siegħa u ma għandhomx l-ewwel wild tad-duqqajs. Għandhom ikunu derivati minn stokk b'saħħtu (jiġifieri ma juri l-ebda sinjal ta' stress bħall-mortalità għolja, il-preżenza ta' maskili u efippja, dewmien fil-produzzjoni tal-ewwel duqqajs, annimali skuluriti, eċċ.). L-annimali tal-istokk għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet tal-kultura (dawl, temperatura, medium, għalf u annimali għall-kull unità ta' volum) simili għal dawk użati fit-test. Jekk il-medium tal-kultura ta' Daphnia li jkun sejjer jintuża fit-test huwa differenti minn dak użat għall-kultura tas-soltu ta' *Daphnia*, hija prattika tajba li jkun inkluż perjodu ta' akklimatizzazzjoni ta' qabel it-test li normalment jieħu 3 ġimgħat (jiġifieri ġenerazzjoni waħda) sabiex ikun evitat stress fuq l-annimali ġenituri.

Medium tat-test

Huwa rakkomandat li jintuża medium li huwa kompletament definit f'dan it-test. Dan jista' jevita l-użu ta' addittivi (eż. alga, estratt tal-ħamrija), li diffiċli jiġu kkaratterizzati, u għalhekk itejjeb l-opportunitajiet għall-istandardizzar bejn il-laboratoji. Instab li media Elendt M4 (6) u M7 (ara l-Appendiċi 2) huma adegwati għal dan il-għan. Madankollu, media oħrajn (eż. (7) (8)) huma aċċettabbli diment li jintwera li l-prestazzjoni tal-kultura ta' *Daphnia* tissodisfa l-kriteji ta' validità għat-test.

([1]) Jistgħu jintużaw dafnidi oħrajn diment li dawn jissodisfaw il-kriterji ta' validita' kif xieraq (il-kriterju ta' validita' relatat mall-eżitu riproduttiv fil-kontrolli għandu jkun rilevanti għall-ispeċijiet kollha). Jekk jintużaw dafnidi oħrajn, dawn għandhom ikunu identifikati biċ-ċar u jrid jiġi ġġustifikat l-użu tagħhom.

▼M7

Jekk jintużaw media li jinkludu addittivi li mhumiex definiti, dawn l-addittivi għandhom ikunu speċifikati ċari u l-informazzjoni għandha tkun ipprovduta fir-rapport tat-test dwar il-kompożizzjoni, partikolarment fir-rigward tal-kontenut ta' karbonju għaliex dan jista' jikkontribwixxi għad-dieta stipulata. Huwa rakkomandat li jiġi ddeterminat il-karbonju organiku totali (TOC) u/jew id-domanda kimika ta' ossiġenu (COD) tal-preparazzjoni tal-istokk tal-addittiv organiku u li ssir stima tal-kontribuzzjoni li tirriżulta tal-TOC/COD fil-medium tat-test. Huwa rakkomandat ukoll li l-livelli ta' TOC fil-medium (jiġifieri qabel iż-żieda tal-algi) ikunu inqas minn 2 mg/l (9).

Meta jkunu qegħdin jiġu ttestjati sustanzi kimiċi li fihom hemm metalli, huwa importanti li wieħed jirrikonoxxi li l-medium tat-test (eż. ebusija, kapaċità kelanti) jista' jkollu impatt fuq it-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test. Għal din ir-raġuni, idealment jintuża medium kompletament definit. Madankollu, bħalissa, l-uniċi media li huma definiti kompletament magħrufin bħala adegwati għall-kultura fit-tul ta' *Daphnia magna* huma Elendt M4 u M7. Iż-żewġ media fihom l-aġent kelanti EDTA. Ix-xogħol wera (2) illi t-"tossiċità apparenti" tal-kadmju hija ġeneralment inqas meta t-test tar-riproduzzjoni isir fil-media M4 u M7 milli meta kienu fil-media li ma kienx fihom EDTA. Għalhekk, M4 u M7 mhumiex irrakkomandati għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi li fihom metalli, u media oħrajn magħrufin li fihom aġenti kelanti għandhom ikunu evitati wkoll. Għal sustanzi kimiċi li fihom il-metall, jista' jkun rakkomandat li jintuża medium ieħor bħal, pereżempju ilma ħelu iebes rikostitwit tal-ASTM (9), li ma fih ebda EDTA. Dan it-taħlita ta' ilma ħelu iebes rikostitwit tal-ASTM u estratt tal-alga (10) hija xierqa għall-kultura fit-tul ta' *Daphnia magna* (2).

Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun ogħla minn 3 mg/l fil-bidu u matul it-test. Il-pH għandha tkun bejn 6 — 9, u normalment m'għandhiex tvarja b'aktar minn 1.5 unitajiet f'test wieħed. Hija rakkomandata ebusija 'il fuq minn 140 mg/l (bħal $CaCO_3$). Testijiet f'dan il-livell u iktar urew prestazzjoni riproduttiva konformi mal-kriteji ta' validità (11) (12).

Soluzzjonijiet tat-test

Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin normalment jitħejjew b'dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Idealment, is-soluzzjonijiet ewlenin għandhom jiġu ppreparati, mingħajr ma jintuża ebda solvent jew aġent dispersiv, permezz ta' tħallit jew theżżiż tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tat-test bl-użu ta' mezzi mekkaniċi bħat-theżżiż, it-tħawwid jew l-ultrasonikazzjoni, jew metodi xierqa oħrajn. Idealment is-sistemi tat-test jiġu esposti għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test li sejrin jintużaw fl-istudju għat-tul ta' żmien meħieġ sabiex tintwera ż-żamma ta' konċentrazzjonijiet tal-esponiment stabbli qabel l-introduzzjoni tal-organiżmi tat-test. Jekk is-sustanza kimika tat-test diffiċli biex tiġi dissolta fl-ilma, għandhom jiġu segwiti l-proċeduri deskritti fil-Gwida tal-OECD għall-immaniġġjar ta' sustanzi diffiċli (13). L-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi għandu jiġi evitat iżda jista' jkun meħtieġ f'ċerti każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif suppost għad-dożaġġ.

Kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni b'repliki adegwati u, jekk dan ma jkunx evitabbli, kontroll tas-solvent b'repliki adegwati għandu jintuża minbarra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Fit-test għandhom jintużaw solventi jew aġenti dispersivi biss li ġew investigati li ma għandhomx effetti sinifikanti jew minimi biss fuq il-varjabbli tar-rispons. Eżempji ta' solventi xierqa (eż. aċeton, etanol, metanol,

▼M7

dimetilformammid u glikol tat-trietilen) u aġenti dispersivi (eż. Cremophor RH40, metilċelluloża 0.01 % u HCO-40) jingħataw fi (13). Meta jintuża solvent jew aġent dispersiv, il-konċentrazzjoni finali tiegħu ma għandhiex tkun ikbar minn 0.1 ml/l (13) u għandha tkun l-istess konċentrazzjoni fir-reċipjenti kollha tat-test, ħlief il-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Madankollu, għandu jsir kull sforz biex il-konċentrazzjoni tas-solvent tinżamm għall-minimu possibbli.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tal-Esponiment

Durata

Id-durata tat-test hija ta' 21 jum.

Tagħbija

L-annimali ġenituri jinżammu għalihom, wieħed għal kull reċipjent tat-test, normalment b'50 — 100 ml (għal *Daphnia magna*, jistgħu jkunu possibbli volummi iżgħar, speċjalment għal dafnidi iżgħar eż. *Ceriodaphnia dubia*) ta' medium f'kull reċipjent, sakemm ma jkunx hemm bżonn ta' disinn tat-test bi fluss kontinwu għall-ittestjar.

Kultant jista' jkun hemm bżonn ta' volumi akbar sabiex jintlaħqu r-rekwiżiti tal-proċedura analitika użata sabiex tkun determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, għalkemm ir-raggruppament tar-repliki għall-analiżi kimika huwa permess ukoll. Jekk jintużaw volumi akbar minn 100 ml, il-porzjon mogħtija lid-*Daphnia* jaf ikollha bżonn li tiżdied sabiex ikun żgurat li jkun hemm provvista adegwata tal-ikel u konformità mall-kriterji tal-validità.

L-annimali tat-test

Għat-testijiet semistatiċi, tal-inqas 10 annimali miżmuma individwalment f'kull konċentrazzjoni tat-test u tal-inqas 10 annimali miżmuma individwalment f'serje tal-kontrolli.

Għal testijiet bi fluss kontinwu, intwera li 40 annimal maqsuma f'erba' gruppi ta' 10 annimali f'kull konċentrazzjoni tat-test huma adegwati (1). Huwa rakkomandat li jintuża numru iżgħar ta' organiżmi tat-test u tal-inqas 20 annimal għal kull konċentrazzjoni maqsuma f'żewg repliki jew iktar bl-istess numru ta' annimali (e.ż. erba' repliki kull wieħed b'ħames dafnidi). Kun af li għal testijiet li fihom l-annimali jinżammu fil-gruppi, mhuwiex sejjer ikun possibbli li jiġi eskluż kwalunkwe nisel mill-analiżi statistika jekk isseħħ mortalità mhux intenzjonata/ aċċidentali tal-ġenitur meta tkun bdiet ir-riproduzzjoni, u b'hekk f'dawn il-każijiet l-eżitu riproduttiv għandu jiġi espress bħala n-numru totali ta' nisel ħaj prodott għal kull ġenitur preżenti fil-bidu tat-test.

It-trattamenti għandhom ikunu allokati għar-reċipjenti tat-test u kull immaniġġjar sussegwenti tar-reċipjenti tat-test għandhom isiru b'mod aleatorju. Nuqqas milli jsir hekk jista' jirriżulta fi preġudizzju li jista' jittieħed bħala effett ta' konċentrazzjoni. B'mod partikolari, jekk unitajiet esperimentali jiġu mmaniġjati f'ordni tat-trattament jew tal-konċentrazzjoni, jiġri li xi effett relatat mal-ħin, bħall-għeja tal-operatur jew xi żball ieħor, jista' jwassal għall-effetti akbar f'konċentrazzjonijiet ogħla. Barra minn hekk, jekk ir-riżultati tat-test aktarx li sejrin ikunu affettwati minn kundizzjoni inizjali jew ambjentali tat-test, bħall-posizzjoni fil-laboratorju, għandu jiġi kkunsidrat l-imblokkar tat-test.

Għalf

Għal testijiet semistatiċi, idealment it-tagħlif għandu jsir kulljum, iżda mill-inqas tliet darbiet fil-ġimgħa (jiġifieri li jikkorrispondi għall-bidliet fil-media). Id-dilwizzjoni possibbli tal-konċentrazzjonijiet tal-esponiment b'żieda tal-ikel għandha tiġi kkunsidrata u evitata kemm jista' jkun b'sospensjonijiet tal-alga kkonċentrati sew. Għandhom ikunu rrapportati devjazzjonijiet minn dan (eż. għal testijiet bi fluss kontinwu).

Waqt it-test, idealment, id-dieta tal-annimali ġenituri għandha tkun ċelloli ta' algi ħajjin ta' waħda jew aktar minn dawn li ġejjin: *Chlorella sp., Pseudokirchneriella subcapitata* (qabel kienet imsejħa *Selenastrum capricornutum*) u *Desmodesmus subspicatus* (qabel kienet imsejħa *Scenedesmus subspicatus*). Id-dieta mogħtija għandha tkun ibbażata fuq l-ammont ta' karbonju organiku (C) ipprovduta f'kull annimal ġenitur. Ir-riċerka (14) uriet li, għal *Daphnia magna*, livelli ta' porzjon

▼M7

ta' bejn 0.1 u 0.2 mg C/*Daphnia*/jum huma biżżejjed sabiex jintlaħaq in-numru mitlub ta' nisel ħaj sabiex jintlaħaq il-kriteju ta' validità tat-test. Il-porzjon tista' tkun fornita f'rata kostanti matul il-perjodu tat-test, jew, jekk mixtieq, tista' tintuża rata aktar baxxa fil-bidu u mbagħad tiżdied matul it-test sabiex jittieħed f'kunsiderazzjoni t-tkabbir tal-annimali ġenituri. F'dan il-każ, il-porzjon xorta għandha tibqa' fil-medda rakkomandata ta' 0.1 — 0.2 mg C/*Daphnia*/jum f'kull ħin.

Jekk jintużaw miżuri surrogati, bħan-numru ta' ċelloli ta' algi jew l-assorbiment tad-dawl, sabiex jingħataw il-livell meħtieġ ta' porzjon (jiġifieri għall-konvenjenza minħabba li l-kejl tal-kontenut ta' karbonju jieħu l-ħin), kull laboratorju għandu jipproduċi n-nomograff proprju tiegħu relatat mal-miżura sostituta tal-kontenut ta' karbonju tal-kulturi ta' algi (ara l-Appendiċi 3 għal pariri dwar il-produzzjoni ta' nomograff). In-nomografi għandhom ikunu vverifikati mill-inqas kull sena jew aktar jekk jinbidlu l-kundizzjonijiet tal-kultura tal-algi. Instab li l-assorbiment tad-dawl huwa surrogat aħjar għall-kontenut ta' karbonju milli numru ta' ċelloli (15).

Għandha tingħata sospensjoni ta' alga kkonċentrata lid-*Daphnia* sabiex jitnaqqas il-volum ta' medium tal-kultura ta' algi ttrasferit fir-reċipjenti tat-test. Il-konċentrazzjoni tal-algi tista' tinkiseb b'ċentrifugazzjoni segwita mir-risospensjoni fil-medium tal-kultura ta' *Daphnia*.

Dawl

16-il siegħa dawl f'intensità li ma taqbiżx il-15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ imkejla fil-wiċċ tal-ilma tar-reċipjent. Għal strumenti li jkejlu d-dawl ikkalibrati f'lux, medda ekwivalenti ta' 1 000 — 1 500 lux għal dawl abjad bati tikkorrispondi bejn wieħed u ieħor għall-intensità ta' dawl rakkomandata ta' 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Temperatura

It-temperatura tal-media tat-test għandha tkun fi ħdan il-medda ta' 18-22 °C. Madankollu, għal kull test, it-temperatura ma għandhiex tvarja, kemm jista' jkun possibbli, b'aktar minn 2 °C bejn dawn il-limiti (eż. 18-20, 19-21 jew 20-22 °C) bħala medda ta' kuljum. Jista' ikun xieraq li jintuża reċipjent tat-test ieħor għall-fini ta' monitoraġġ tat-temperatura.

Ossiġenazzjoni

Ir-reċipjenti tat-test ma għandhomx jiġu ossiġenati matul it-test.

Disinn tat-test

Test tas-sejbien tal-medda

Meta jkun hemm bżonn, isir test tas-sejbien tal-medda, pereżempju b'ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u żewġ repliki għal kull trattament u kontroll. Informazzjoni addizzjonali, minn testijiet b'sustanzi kimiċi simili jew minn tagħrif, dwar it-tossiċità akuta għad-*Daphnia* u/jew organiżmi akkwatiċi oħrajn, tista' tkun siewja wkoll meta tittieħed deċiżjoni fuq il-medda ta' konċentrazzjonijiet li ser jintużaw fit-test tas-sejbien tal-medda.

Id-durata tat-test tas-sejbien tal-medda hija ta' 21 jum jew durata twila biżżejjed sabiex ikunu jistgħu jitbassru b'mod affidabbli l-livelli tal-effetti. Fi tmiem it-test tiġi vvalutata r-riproduzzjoni tad-*Daphnia*. Għandhom jiġu rreġistrati n-numru ta' ġenituri u l-okkorrenza ta' nisel.

Test definittiv

Normalment għandu jkun hemm tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test, li jkopru l-konċentrazzjoni effettiva (eż. EC_x), u dawn għandhom ikunu rranġati f'serje ġeometrika b'fattur ta' separazzjoni li idealment ma jaqbiżx it-3.2 Għandu jintuża numru xieraq ta' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test (ara l-paragrafi 24-25). Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn ħames

▼M7

konċentrazzjonijiet. Is-sustanzi kimiċi ma għandhomx ikunu ittestjati 'il fuq mill-limitu ta' solubilità tagħhom fil-medium tat-test. Qabel ma jsir l-esperiment, huwa rakkomandat li tiġi kkunsidrata s-saħħa statistika tad-disinn tat-testijiet u li jintużaw metodi statistiċi xierqa (4). Fl-istabbiliment tal-medda ta' konċentrazzjonijiet, wieħed għandu jżomm f'moħħu dan li ġej:

(i) Jekk tiġi stmata l-EC_x għall-effetti fuq ir-riproduzzjoni, huwa rakkomandatli jintużaw konċentrazzjonijiet għoljin biżżejjed sabiex tiġi definita l-EC_x b'livell xieraq ta' kunfidenza. Idealment, il-konċentrazzjonijiet tat-test użati għandhom ikopru l-EC_x stmata b'tali mod li l-EC_x tinstab b'interpolazzjoni minflok estrapolazzjoni. Huwa vantaġġ għall-analiżi statistika li ġejja li jintużaw iktar konċentrazzjonijiet tat-test (eż. 10) u inqas repliki f'kull konċentrazzjoni (eż. 5 b'hekk jinżamm in-numru totali ta' kostant tar-reċipjenti) u b'10 kontrolli.

(ii) Meta tiġi stmata l-LOEC u/jew l-NOEC, l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex b'hekk l-eżitu riproduttiv f'dik il-konċentrazzjoni ma jkunx sinifikatament inqas minn dak tal-kontroll. Jekk dan mhuwiex il-każ, it-test għandu jkun ripetut bl-inqas konċentrazzjoni mnaqqsa.

(iii) Meta tiġi stmata l-LOEC u/jew l-NOEC, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed sabiex b'hekk l-eżitu riproduttiv f'dik il-konċentrazzjoni jkun sinifikatament inqas minn dak tal-kontroll. Jekk dan ma jkunx il-każ, it-test għandu jiġi ripetut bl-ogħla konċentrazzjoni miżjuda sakemm ma tintużax il-konċentrazzjoni tat-test massima meħtieġa għall-ittestjar tal-effetti kroniċi (jiġifieri 10 mg/l) bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test fit-test inizjali.

Jekk ma jiġi osservat ebda effett fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejbien tal-medda (eż. f'10 mg/l), jew meta s-sustanza kimika tat-test jkolllha probabilità għolja li tkun baxxa/ ebda tossiċità fuq il-bażi tat-tossiċità għal organiżmi oħrajn u/jew ebda teħid/teħid baxx, it-test tar-riproduzzjoni jista' jsir bħala test tal-limitu, bl-użu ta' konċentrazzjoni tat-test ta' eż. 10 mg/l u l-kontroll. Għandhom jintużaw għaxar repliki kemm għall-grupp tat-trattament kif ukoll tal-kontroll. Meta jista' jkollu bżonn isir test tal-limitu f'sistema bi fluss kontinwu, ikun biżżejjed li jintgħażlu inqas repliki. Test tal-limitu sejjer jipprovdi l-opportunità li jintwera li ma hemm ebda effett statistikament sinifikanti fil-konċentrazzjoni ta' limitu, iżda jekk jiġu rreġistrati effetti, normalment ikun hemm bżonn li jsir test sħiħ.

Kontrolli

Minbarra s-serje tat-test, għandha ssir ukoll serje waħda tal-kontroll tal-medium tat-test u, jekk rilevanti, serje waħda tal-kontroll li fiha s-solvent jew l-aġent dispersiv. Meta tintuża, il-konċentrazzjoni tas-solvent jew tal-aġent dispersiv għandha tkun l-istess bħal dik użata fir-reċipjenti li fihom is-sustanza kimika tat-test. Għandu jintuża n-numru xieraq ta' repliki (ara l-paragrafi 23-24).

Ġeneralment, f'test magħmul tajjeb, il-koeffiċjent ta' varjazzjoni madwar in-numru medju ta' nisel ħaj prodott għal kull annimal ġenitur fil-kontroll(i) għandu jkun ta' ≤ 25 %, u dan għandu jkun irrapportat għad-disinni tat-test bl-użu ta' annimali miżmumin individwalment.

Tiġdid tal-medium tat-test

Il-frekwenza tat-tiġdid tal-medium tiddependi mill-istabilità tas-sustanza kimika tat-test, iżda għandha tkun mill-inqas ta' tliet darbiet fil-ġimgħa. Jekk, mit-testijiet preliminari tal-istabilità (ara l-paragrafu 7) il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx stabbli (jiġifieri barra l-medda ta' 80 — 120 % tal-valur nominali jew li taqa' taħt it-80 % tal-konċentrazzjoni inizjali mkejla) fuq il-perjodu massimu ta' tiġdid (jiġifieri 3 ijiem), wieħed għandu jieħu f'kunsiderazzjoni it-tiġdid iktar spiss tal-medium, jew l-użu ta' test bi fluss kontinwu.

▼M7

Meta l-medium jiġġedded f'testijiet semistatiċi, titħejja t-tieni sensiela ta' reċipjenti tat-test u l-annimali ġenituri jiġu ttrasferiti fihom, pereżempju, b'pipetta tal-ħġieġ b'dijametru xieraq. Il-volum ta' medium ittrasferit bid-*Daphnia* għandu jkun minimizzat.

Osservazzjonijiet

Ir-riżultati tal-osservazzjonijiet li jsiru matul it-test għandhom jiġu rreġistrati fuq skedi ta' dejta (ara l-eżempji fl-Appendiċijiet 4 u 5). Jekk ikunu meħtieġa miżuri oħrajn (ara l-paragrafu 44), jista' jkun hemm bżonn ta' osservazzjonijiet addizzjonali.

Nisel

In-nisel prodott minn kull annimal ġenitur idealment għandu jitneħħa u jingħadd ta' kuljum mid-dehra tal-ewwel duqqajs sabiex jiġi evitat milli dawn jieklu ikel maħsub għall-ġenitur. Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, huwa biss in-numru ta' nisel ħaj li jrid jingħadd, iżda l-preżenza ta' bajd abortit jew nisel mejjet għandha tiġi rreġistrata.

Mortalità

Mortalità fl-annimali ġenituri għandha tkun irreġistrata, idealment kuljum, jew tal-inqas bl-istess frekwenza li biha jingħadd in-nisel.

Parametri oħrajn

Għalkemm dan il-metodu huwa maħsub prinċiparjament sabiex jiġi vvalutat l-eżitu riproduttiv, huwa possibbli li jkunu kkwantifikati biżżejjed effetti oħra li jippermettu li ssir analiżi statika. Jista' jiġi rreġistrat l-eżitu riproduttiv għal kull annimal ġenitur, jiġifieri n-numru ta' nisel ħaj prodott matul it-test għal kull ġenitur sopravissut. Dan it-test jista' jitqabbel mal-varjabbli tar-rispons ewlieni (eżitu riproduttiv għal kull annimal ġenitur fil-bidu tat-test li ma mietx b'mod mhux intenzjonat jew aċċidentali matul it-test). Jekk isseħħ mortalità tal-ġenituri f'repliki esposti, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-mortalità ssegwix mudell ta' rispons għall-konċentrazzjoni, eż. jekk hemmx rigressjoni sinifikanti tar-rispons kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test b'pendil pożittiv (għal dan jista' jintuża test statistiku bħat-test tat-tendenza Cochran-Armitage). Jekk il-mortalità ma ssegwix xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, dawk ir-repliki b'mortalità tal-ġenituri għandhom jiġu eskluży mill-analiżi tar-riżultat tat-test. Jekk il-mortalità ssegwi xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, il-mortalità tal-ġenituri għandha tiġi assenjata bħala effett tas-sustanza kimika tat-test u r-repliki ma għandhomx jiġu eskluży mill-analiżi tar-riżultat tat-test. Il-kejliet tat-tkabbir ikunu tassew siewja għaliex jipprovdu informazzjoni fuq effetti sottoletali possibbli li jistgħu jkunu utli għaliex iżidu mal-miżuri ta' riproduzzjoni waħedhom; huwa rakkomandat li jitkejjel it-tul tal-annimali ġenituri (jiġifieri t-tul tal-ġisem minbarra l-ispina anali). Parametri oħrajn li jistgħu jitkejlu jew jiġu kkalkolati jinkludu ż-żmien għall-produzzjoni tal-ewwel duqqajs (u dawk ta' wara), in-numru u d-daqs tad-duqqajs għal kull annimal, in-numru ta' duqqajs abortit, il-preżenza ta' neonati rġiel (OECD, 2008) jew efippja u possibilment ir-rata intrinsika ta' żieda fil-popolazzjoni (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni u l-Appendiċi 7 għall-identifikazzjoni tas-sess tan-neonati).

Il-frekwenza tad-determinazzjonijiet analitiċi u tal-kejliet

Il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu, it-temperatura, l-ebusija u l-valuri tal-pH għandhom jitkejlu mill-inqas darba fil-ġimgħa, f'media ġodda u qodma, fil-kontroll(i) u fl-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu ddeterminati f'intervalli regolari.

F'testijiet semistatiċi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test tkun maħsuba li sejra tibqa' bejn ± 20 fil-mija tan-nominali (jiġifieri fil-limitu ta' 80 — 120 fil-mija- ara l-paragrafi 6, 7 u 39), huwa rrakomandat li, bħala minimu,

▼M7

jiġu analizzati l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test meta jkunu ppreparati ġodda u fil-ħin tat-tiġdid darba waqt l-ewwel ġimgħa tat-test (jiġifieri l-analiżijiet għandhom isiru fuq kampjun tal-istess soluzzjoni — meta tkun għadha kemm ġiet ippreparata u meta tiġġedded). Dawn id-determinazzjonijiet għandhom ikunu irripetuti mill-inqas f'intervalli ta' kull ġimgħa wara dan.

Għal testijiet li fihom il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx maħsuba li sejra tibqa' fil-limiti ± 20 fil-mija tan-nominali, huwa neċessarju li ssir analiżi tal-konċentrazzjonijiet kollha tat-test, meta tiġi ppreparata ġdida jew meta tiġġedded. Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx fl-± 20 fil-mija tan-nominali iżda tista' tiġi pprovduta biżżejjed evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (jiġifieri fil-limitu ta' 80-120 fil-mija tal-konċentrazzjonijiet inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitnaqqsu fil-ġimgħat 2 u 3 tat-test għall-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test qabel jiġġeddu tista' ssir f'reċipjent tar-replika wieħed f'kull konċentrazzjoni tat-test.

Jekk jintuża test bi fluss kontinwu, reġim tal-kampjunar simili għal dak deskritt għat-testijiet semistatiċi jkun adattat (iżda l-kejl ta' soluzzjonijiet "qodma" ma jkunx applikabbli f'dan il-każ). Madankollu, jista' jkun rakkomandat li jiżdied in-numru ta' okkażjonijiet ta' kampjunar matul l-ewwel ġimgħa (eż. tliet settijiet ta' kejl) sabiex jiġi żgurat li l-konċentrazzjonijiet tat-test jibqgħu stabbli. F'dawn it-tipi ta' testijiet, ir-rata tal-fluss tad-dilwent u s-sustanza kimika tat-test għandha tiġi vverifikata kuljum.

Jekk ikun hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li tkun qiegħda tiġi ttestjata inżammet kif xieraq fl-± 20 fil-mija tan-nominali jew fil-konċentrazzjoni inizjali matul it-test, mela r-riżultati jistgħu jkunu ibbażati fuq il-valuri nominali jew inizjali mkjelin. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni nominali jew dik inizjali mkejla tkun ikbar minn ±20 fil-mija, ir-riżultati għandhom jingħataw f'termini tal-medja ponderata għaż-żmien (ara l-gwida dwar il-kalkolu fl-Appendiċi 6).

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

L-iskop ta' dan it-test huwa li jistabbilixxi l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq l-eżitu riproduttiv. In-numru totali ta' nisel ħaj għal kull annimal ġenitur għandu jiġi kkalkolat għal kull reċipjent tat-test (jiġifieri replika). Barra minn hekk, ir-riproduzzjoni tista' tiġi kkalkolata fuq il-bażi tal-produzzjoni ta' nisel ħaj mill-organiżmu ġenitur li jkun għadu ħaj. Madankollu, l-iktar varjabbli tar-rispons ekoloġikament rilevanti huwa n-numru totali ta' nisel ħaj prodott għal kull annimal ġenitur li ma jmutx b'mod aċċidentali ([1]) jew mhux intenzjonat ([2]) matul it-test. Jekk l-annimal ġenitur imut b'mod aċċidentali jew mhux intenzjonat matul it-test, jew jirriżulta li huwa raġel, ir-replika tiġi eskluża mill-analiżi. Imbagħad l-analiżi sejra tkun ibbażata fuq numru iżgħar ta' repliki. Jekk isseħħ mortalità tal-ġenituri f'repliki esposti, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-mortalità ssegwix mudell ta' rispons għall-konċentrazzjoni, eż. jekk hemmx rigressjoni sinifikanti tar-rispons kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test b'pendil pożittiv (għal dan jista' jintuża test statistiku bħat-test tat-tendenza Cochran-Armitage). Jekk il-mortalità ma ssegwix xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, dawk ir-repliki b'mortalità tal-ġenituri għandhom jiġu eskluži mill-analiżi tar-riżultat tat-test. Jekk il-mortalità ssegwi xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, il-mortalità tal-ġenituri għandha tiġi assenjata bħala effett tas-sustanza kimika tat-test u r-repliki ma għandhomx jiġu eskluži mill-analiżi tar-riżultat tat-test.

Fil-qosor, meta jintużaw LOEC u NOEC jew EC_x sabiex jesprimu l-effetti, huwa rakkomandat li jiġi kkalkolat l-effett fuq ir-riproduzzjoni bl-użu taż-żewġ varjabbli tar-risponsi msemmijin hawn fuq, jiġifieri

([1]) Mortalità aċċidentali: mortalità mhux marbuta mas-sustanza kimika kkaġunata minn inċidenza aċċidentali (jiġifieri kawża magħrufa)

([2]) Mortalità mhux intenzjonata: mortalità mhux marbuta mas-sustanza kimika b'kawża mhux magħrufa

▼M7

— bħala n-numru totali ta' nisel ħaj prodott għal kull annimal li ma jmutx b'mod aċċidentali jew mhux intenzjonata matul it-test u;

— bħala n-numru ta' nisel ħaj prodott għal kull annimal ġenitur li jibqa' ħaj;

u mbagħad sabiex jintuża bħala r-riżultat finali, l-inqas valur NOEC u LOEC jew EC_x ikkalkolat bl-użu ta' wieħed minn dawn iż-żewġ varjabbli tar-rispons.

Qabel ma tintuża l-analiżi statistika, eż. proċeduri ANOVA, paragun tat-trattamenti għall-kontroll bit-test-t Student, it-test Dunnett, it-test Williams, jew it-test stepdown Jonckheere-Terpstra, huwa rakkomandat li tiġi kkunsidrata t-trasformazzjoni ta' dejta jekk ikun hemm bżonn għall-issodsfar tar-rekwiżiti tat-test statistiku partikolari. Bħala alternattivi mhux parametriċi, wieħed jista' jikkunsidra t-testijiet Dunn jew Mann-Whitney. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati għal medji tat-trattamenti individwali.

In-numru ta' ġenituri sopravissuti fil-kontrolli mhux ittrattati huwa kriterju ta' validità, u għandu jiġi ddokumentat u rrapportat. Anki l-effetti dannużi kollha l-oħrajn ukoll, eż. imġiba anormali u sejbiet tossikoloġiċi sinifikanti, għandhom jiġu rrapportati fir-rapport finali.

ECx

Il-valuri EC_x, inklużi l-limiti ta' kunfidenza inferjuri u superjuri assoċjati magħhom huma kkalkolati bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa (eż. il-funzjoni loġistika jew ta' Weibull, il-metodu ta' Spearman-Karber trimmjat, jew sempliċi interpolazzjoni). Sabiex tiġi kkalkolata l-EC_{10}, EC_{50} jew kwalunkwe EC_x oħra, is-sett sħiħ ta' dejta għandu jkun soġġett għal analiżi tar-rigressjoni.

NOEC/LOEC

Jekk analiżi statistika jkollha l-għan li ssib l-NOEC/LOEC, għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa skont id-Dokument 54 tal-OECD dwar Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (4). B'mod ġenerali, effetti avversi tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-kontroll huma investigati bl-użu ta' ttestjar tal-ipoteżi fuq naħa waħda b'$p \leq 0.05$.

Distribuzzjoni normali u omoġenità tal-varjanza jistgħu jiġu ttestjati bl-użu ta' test statistiku xieraq, eż. it-test ta' Shapiro-Wilk u t-test ta' Levene, rispettivament ($p \leq 0.05$). Jistgħu jsiru ANOVA unidirezzjonali u testijiet multiparaguni sussegwenti. Jistgħu jintużaw testijiet b'bosta paraguni (eż. it-test ta' Dunnett) jew testijiet tax-xejriet rigressivi (eż. it-test ta' Williams, jew it-test stepdown ta' Jonckheere-Terpstra) sabiex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi importanti ($p \leq 0.05$) bejn il-kontrolli u l-bosta konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test (għażla tat-test irrakkomandat skont id-Dokument ta' Gwida 54 tal-OECD (4)). Inkella, jistgħu jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. test-U-Bonferroni skont it-test tax-xejriet ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) sabiex jiġu stabbiliti l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

Jekk sar test tal-limitu (paragun tal-kontroll u trattament wieħed biss) u l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametriku (normalità, omoġenità) huma ssodisfati, ir-risponsi metriċi jistgħu jiġu evalwati mit-test ta' Student (test-t). Jista' jintuża test-t tal-varjanza mingħajr ekwivoku (bħat-test ta' Welch) jew test mhux parametriku, bħat-test ta' Mann-Whitney-U, jekk ma jkunux issodisfati dawn ir-rekwiżiti.

Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent jew kontroll dispersiv), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

▼M7

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test:

— l-għamla fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti;

— dejta dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika, inkluża l-purità.

Speċijiet tat-test:

— il-klonu (jekk ġiex tipat ġenetikament), il-fornitur jew is-sors (jekk magħruf) u l-kundizzjonijiet tal-kultura użati. Jekk tintuża speċi differenti minn *Daphnia magna*, din għandha tiġi rrapportata u ġġustifikata.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-proċedura tat-test użata (eż. semistatika jew fluss kontinwu, il-volum, it-tagħbija f'numru ta' *Daphnia* kull litru);

— il-fotoperjodu u l-intensità tad-dawl;

— id-disinn tat-test (eż. numru ta' repliki, numru ta' ġenituri għal kull replika);

— dettalji dwar il-medium tal-kultura użat;

— jekk jintużaw, żidiet ta' materjali organiċi inklużi l-kompożizzjoni, is-sors, il-metodu ta' tħejjija, it-TOC/COD tal-preparazzjonijiet tal-istokk, stima tat-TOC/COD li jirriżultaw fil-medium tat-test;

— informazzjoni dettaljata dwar l-għalf, inkluż ammont (f'mg C/*daphnia*/jum) u l-iskeda (eż. tip ta' ikel, inkluż għall-algi b'ismijiet speċifiċi (speċi) u, jekk magħrufin, ir-razza, il-kundizzjonijiet tal-kultura);

— metodu tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna u l-frekwenza tat-tiġdid (is-solvent jew l-aġent dispersiv u l-konċentrazzjoni tagħhom għandhom jingħataw, meta jintużaw).

Ir-riżultati:

— riżultati minn kwalunkwe studju preliminari fuq l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali u r-riżultati tal-analiżijiet kollha sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test (ara l-iskedi ta' dejta ta' eżempju fl-Appendiċi 5); l-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-limitu tad-determinazzjoni għandhom ikunu irrapportati wkoll;

— il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test (jiġifieri l-pH, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, u TOC u/jew COD u l-ebusija fejn applikabbli (ara l-iskedi ta' dejta ta' eżempju fl-Appendiċi 4);

— ir-rekord sħiħ tal-produzzjoni ta' niesl ħaj matul it-test minn kull annimal ġenitur (ara l-iskeda ta' dejta ta' eżempju fl-Appendiċi 4);

— in-numru ta' mwiet fost l-annimali ġenituri u l-jum meta seħħew (ara l-iskedi ta' dejta ta' eżempju fl-Appendiċi 4);

— il-koeffiċjent ta' varjazzjoni għall-eżitu riproduttiv fil-kontroll (fuq il-bażi tan-numru totali ta' nisel ħaj għal kull annimal ġenitur ħaj fi tmiem it-test);

— il-plott tan-numru totali ta' nisel ħaj prodott għal kull ġenitur ħaj f'kull replika eskluż kwalunkwe annimal ġenitur li seta' miet b'mod aċċidentali jew mhux intenzjonat matul it-test kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

▼M7

— kif xieraq, ipplottja n-numru totali ta' nisel ħaj prodott għal kull annimal ġenitur li jkun għadu ħaj f'kull replika kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

— fejn xieraq, il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) għar-riproduzzjoni, inkluża deskrizzjoni tal-proċeduri statistiċi użati u indikazzjoni ta' x'daqs tal-effett jista' jkun mistenni li jiġi individwat (analiżi tas-saħħa tista' ssir qabel ma jibda l-esperiment sabiex jiġi pprovdut) u l-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) għar-riproduzzjoni; l-informazzjoni li fuqha ntuża l-varjabbli tar-rispons għall-kalkolu tal-valur tal-LOEC u l-NOEC (jew bħala nisel ħaj totali għal kull organiżmu matern li ma mietx b'mod aċċidentali jew mhux intenzjonat matul it-test jew bħala numru totali ta' nisel ħaj għal kull organiżmu matern li jkun għadu ħaj), fejn xieraq, għandhom jiġu rrapportati wkoll l-LOEC u l-NOEC għall-mortalità tal-annimali ġenituri;

— fejn xiearq, l-ECx għar-riproduzzjoni u l-intervalli ta' kunfidenza (eż. 90 % jew 95 %) u graff tal-mudell iffittjat użat għall-kalkolu ta' dawn, il-pendil tal-kurva ta' konċentrazzjoni — rispons u l-iżball standard tagħha;

— kejliet jew effetti bijoloġiċi osservati oħrajn: irrapporta kwalunkwe effett bijoloġiku ieħor li ġie osservat jew li tkejjel (eż. tkabbir ta' annimali ġenituri) inkluża kwalunkwe ġustifikazzjoni xierqa;

— spjegazzjoni ta' kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu ta' ttestjar.

TAGĦRIF

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Fi: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. Fi: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Għall-finijiet ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Mortalità aċċidentali: mortalità mhux marbuta mas-sustanza kimika kkaġunata minn inċidenza aċċidentali (jiġifieri kawża magħrufa)

Sustanza Kimika: sustanza jew taħlita.

EC_x: il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test dissolta fl-ilma li tirriżulta fi tnaqqis ta' x fil-mija fir-riproduzzjoni ta' *Daphnia* fi ħdan perjodu ta' esponiment ddikjarat.

Mortalità mhux intenzjonata: mortalità mhux marbuta mas-sustanza kimika b'kawża mhux magħrufa.

Rata intrinsika ta' żieda fil-popolazzjoni: kejl tat-tkabbir tal-popolazzjoni li jintegra l-eżitu riproduttiv u l-mortalità speċifika għall-età (1) (2) (3). F'popolazzjonijiet fi stat stazzjonarju, sejra tkun żero. Għall-popolazzjonijiet li qegħdin jikbru din tkun posittiva u għall-popolazzjonijiet li qegħdin jonqsu din tkun negattiva. Huwa ċar li tal-aħħar mhijiex sostenibbli u finalment sejra twassal għal estinzjoni.

Limitu ta' detezzjoni: l-inqas konċentrazzjoni li tista' tiġi identifikata iżda mhux ikkwantifikata.

Limitu ta' determinazzjoni: l-inqas konċentrazzjoni li tista' titkejjel b'mod kwantitattiv.

Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC): l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza hija osservata li jkollha effett statistikalment sinifikanti fuq ir-riproduzzjoni u l-mortalità tal-ġenituri ($b'p < 0.05$) meta mqabbla mall-kontroll, fi ħdan perjodu ta' esponiment stipulat. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha li jkunu ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż daqs jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Mortalità: annimal huwa rreġistrat bħala mejjet meta jkun immobbli, jiġifieri meta ma jkunx aktar kapaci jgħum, jew jekk ma jkun osservat ebda moviment tal-appendiċi jew tal-postaddome, fi żmien 15-il sekonda minn theżżiża bil-galbu tal-kontenitur tat-test. (Jekk tintuża definizzjoni oħra, din għandha tkun irrapportata flimkien mar-referenza tagħha).

Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC): il-konċentrazzjoni tat-test eżatt inqas mil-LOEC, li meta titqabbel mal-kontroll, ma jkollha l-ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0.05$), fi ħdan perjodu ta' esponiment stipulat.

Nisel: id-*Daphnia* żgħar prodotti mill-annimali ġenituri waqt it-test.

Annimali Ġenituri: dawk id-*Daphnia* femminili li jkunu preżenti fil-bidu tat-test u li l-eżitu riproduttiv tagħhom ikun l-oġġett ta' studju.

Eżitu riproduttiv: in-numru ta' nisel ħaj prodott mill-annimali ġenituri fi ħdan il-perjodu ta' ttestjar

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Tagħrif

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Appendiċi 2

PREPARAZZJONI TAL-MEDIA ELENDT M7 U M4 DEFINITI KOMPLETAMENT

Akklimazzjoni għall-media Elendt M7 u M4

Xi laboratorji sabu xi diffikultajiet meta trasferixxew direttament id-*Daphnia* għal media M4 (1) u M7. Madankollu, kien hemm xi suċċess b'akklimazzjoni gradwali, jiġifieri biċ-ċaqliq mill-medium proprju għal 30 % Elendt, u wara għal 60 % Elendt u mbagħad għal 100 % Elendt. Il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni jistgħu jdumu sa xahar.

Preparamenti

Mikroelementi

L-ewwel jitħejjew soluzzjonijiet ewlenin separati (I) ta' mikroelementi individwali fl-ilma ta' purità xierqa, eż. dejonizzat, distillat jew b'osmożi riversa. Minn dawn is-soluzzjonijiet ewlenin differenti (I) titħejja t-tieni soluzzjoni ewlenija waħedha (II), li jkun fiha l-mikroelementi kollha (soluzzjoni kombinata), jiġifieri:

Soluzzjoni(jiet) ewlenija/ ewlenin I (sustanza waħedha)	Ammont miżjud mal-ilma	Konċentrazzjoni (relatata mal-medium M4)	Sabiex titħejja soluzzjoni ewlenija kombinata II, żid l-ammont li ġej ta' soluzzjoni ewlenija I mal-ilma	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000 darba	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000 darba	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 darba	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 darba	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000 darba	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 darba	1,0	0,25
$Mo\ Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000 darba	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000 darba	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 darba	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000 darba	1,0	1,0
KI	65	20 000 darba	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 darba	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 darba	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000 darba	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000 darba	—	—
Iż-żewġ soluzzjonijiet Na_2EDTA u $FeSO_4$ jitħejjew waħedhom, jitferrgħu flimkien u jiġu awtoklavati minnufih. Dan jagħti:				
Soluzzjoni Fe-EDTA		1 000 darba	20,0	5,0

▼**M7**

Media M4 u M7

Il-media M4 u M7 jiġu ppreparati bl-użu tas-soluzzjoni ewlenija II, il-makronutrijenti u l-vitamini kif ġej:

	Ammont miżjud mal-ilma	Konċentrazzjoni (relatata mal-medium M4)	Ammont ta' soluzzjoni ewlenija miżjuda sabiex jiġi ppreparat il-medium	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Soluzzjoni ewlenija II (mikroelementi kombinati)		20 darba	50	50
Soluzzjonijiet ewlenija makronutrijenti (sustanza waħedha)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000 darba	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000 darba	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 darba	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 darba	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000 darba	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 darba	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 darba	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 darba	0,1	0,1
Stokk tal-Vitamini Kombinati	—	10 000 darba	0,1	0,1

Is-soluzzjoni ewlenija tal-vitamini kombinati titħejja billi jiżdiedu t-3 vitamini ma' litru ilma, kif muri hawn taħt:

	mg/l			
Kloridrat tat-tjamina	750	10 000 darba		
Ċjanokobalamin (B_{12})	10	10 000 darba		
Bijotina	7,5	10 000 darba		

L-istokk tal-vitamini kombinati jinħażen f'alikwoti żgħar. Il-vitamini jiżdiedu fil-media ftit qabel l-użu.

N.B: Sabiex tiġi evitata l-preċipitazzjoni tal-imluħ meta jitħejjew il-media sħaħ, żid l-alikwoti tas-soluzzjonijiet ewlenin ta' madwar 500 — 800 ml ilma dejonizzat u mbagħad imla sa litru.

N.N.B L-ewwel pubblikazzjoni tal-medium M4 tista' tinstab f'Elendt, B.P. Selenium deficiency in crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

Appendiċi 3

ANALIŻI TA' KARBONJU ORGANIKU TOTALI (TOC) U L-PRODUZZJONI TA' NOMOGRAFF GĦALL-KONTENUT TA' TOC TAL-GĦALF TAL-ALGA

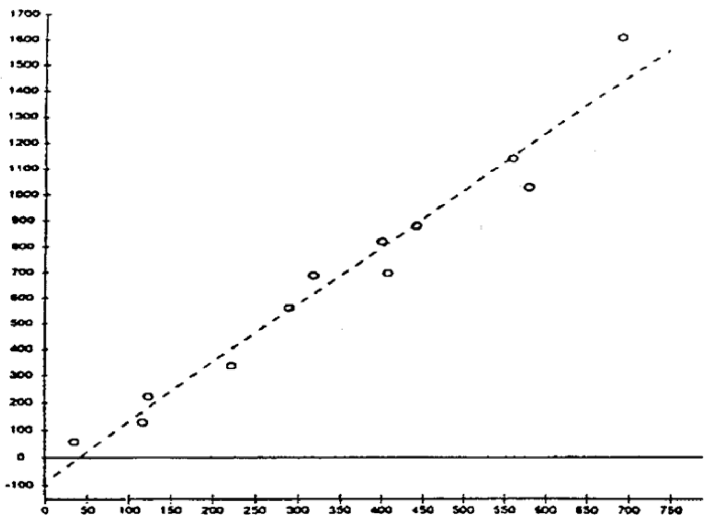
Huwa rikonoxxut li l-kontenut ta' karbonju tal-għalf tal-alga normalment ma jitkejjilx direttament iżda minn korrelazzjonijiet (jiġifieri nomografi) b'miżuri sostituti bħall-għadd taċ-ċelloli tal-alga jew l-assorbiment tad-dawl).

It-TOC għandu jitkejjel b'ossidazzjoni tat-temperatura għolja minflok b'metodi tal-UV jew tal-persulfat. (Għal pariri, ara: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Għall-produzzjoni ta' nomograff, l-algi għandhom ikunu sseparati mill-medium tat-tkabbir b'ċentrifugrazzjoni segwita mir-risospensjoni f'ilma distillat. Kejjel il-parametru sostitut u l-konċentrazzjoni TOC f'kull kampjun fi triplikat. Inbjanki ta' ilma distillat għandhom ikunu analizzati u l-konċentrazzjoni ta' TOC trid titnaqqas minn dik tat-TOC tal-kampjun tal-algi.

In-nomografi għandhom ikunu lineari tul il-medda meħtieġa ta' konċentrazzjonijiet ta' karbonju. Hawn taħt jingħataw eżempji.

N.B dawn ma għandhomx jintużaw għal konverżjonijiet; huwa essenzali li l-laboratorji jippreparaw in-nomografi tagħhom.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

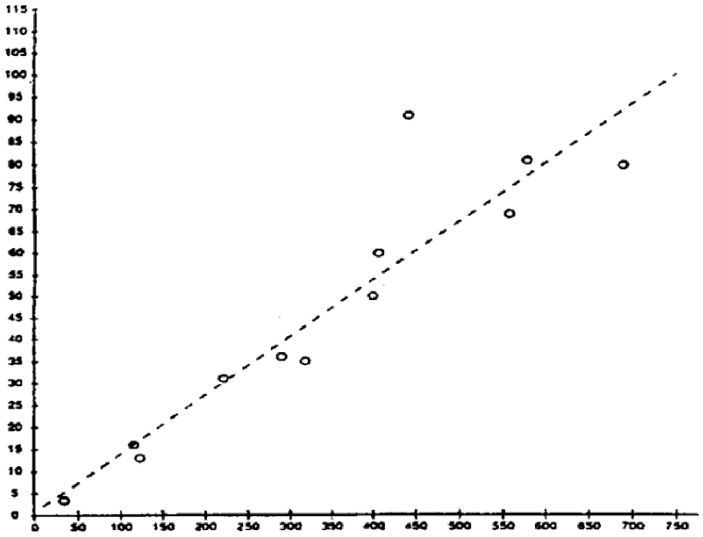
Rigressjoni ta' mg/1 piż niedi fuq mg C/1. Dejta mis-sospensjonijiet ikkonċentrati ta' ċelloli kkulturati tal-lott semikontinwi, risospiżi f'ilma distillat.

assi x: mg C/1 ta' għalf tal-alga konċentrat

assi y: mg/1 piż xott ta' għalf tal-alga konċentrat

Koeffiċjent ta' korrezzjoni – 0,980

▼**M7**



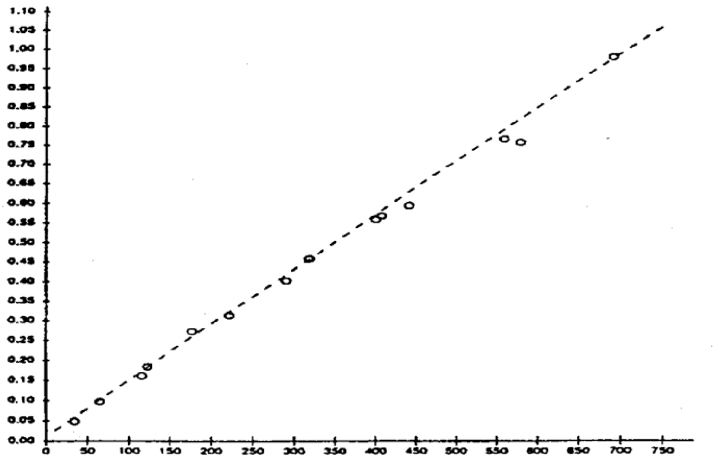
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Rigressjoni tan-numru ta' ċelloli fuq mg C/1. Dejta mis-sospensjonijiet ikkonċentrati ta' ċelloli kkulturati tal-lott semikontinwi, risospiżi f'ilma distillat.

assi x: mg C/1 ta' għalf tal-alga kkonċentrat

assi y: Nru ċelloli/1 tal-għalf tal-alga kkonċentrat

Koeffiċjent ta' korrezzjoni – 0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Rigressjoni tal-assorbiment fuq mg C/1 (tul tal-passaġġ ta' 1 cm). Dejta mis-sospensjonijiet ikkonċentrati ta' ċelloli kkulturati tal-lott semikontinwi, risospiżi f'ilma distillat.

assi x: mg C/1 ta' għalf tal-alga kkonċentrat

assi y: Assorbiment f'440 nm ta' dilwizzjoni ta' 1/10 tal-għalf tal-alga kkonċentrat

Koeffiċjent ta' korrezzjoni – 0,998

▼M7

Appendiċi 4

SKEDA TA' DEJTA TA' EŻEMPJU GĦAR-REĠISTRAZZJONI TAT-TIĠDID TAL-MEDIUM, ID-DEJTA FIŻIKA/KIMIKA TA' MONITORAĠĠ, IT-TAGĦLIF, IR-RIPRODUZZJONI TAD-DAPHNIA U L-MORTALITÀ TAL-ĠENITURI

Esperiment Nru:	Data tal-bidu:						Klonu:			Medium:				Tip ta' ikel:				Sustanza Kimika tat-Test:					Konċ nominali:	
Jum	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Tiġdid tal-medium (immarka)																								
pH (*)																							ġdid	
																							qadim	
O_2 (mg/l) (*)																							ġdid	
																							qadim	
Temp (°C) (*)																							ġdid	
																							qadim	
Ikel ipprovdut (immarka)																								
Nru ta' nisel ħaj (**)																								Total
Reċipjent 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Esperiment Nru:		Data tal-bidu:					Klonu:		Medium:				Tip ta' ikel:				Sustanza Kimika tat-Test:					Konċ nominali:	
Jum	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalità kumulattiva tal-ġenituri (***)																								

(*) Indika liema reċipjent intuża għall-esperiment
(**) Niżżel id-duqqajs abortit bħala "AB" fil-kaxxa rilevanti
(***) Niżżel il-mortalità ta' kwalunkwe annimali ġenituri bħala "M" fil-kaxxa rilevanti

▼**M7**

Appendiċi 5

SKEDA TA' DEJTA TA' EŻEMPJU GĦAR-REĠISTRAZZJONI TA' RIŻULTATI TAL-ANALIŻI KIMIKA

(a) **Il-konċentrazzjonijiet imkejlin**

Konċ. nominali	Kampjun tal-ġimgħa 1		Kampjun tal-ġimgħa 2		Kampjun tal-ġimgħa 3	
	Frisk	Qadim	Frisk	Qadim	Frisk	Qadim

(b) **Il-konċentrazzjonijiet imkejlina bħala perċentwali tan-nominali**

Konċ. nominali	Kampjun tal-ġimgħa 1		Kampjun tal-ġimgħa 2		Kampjun tal-ġimgħa 3	
	Frisk	Qadim	Frisk	Qadim	Frisk	Qadim

▼M7

Appendiċi 6

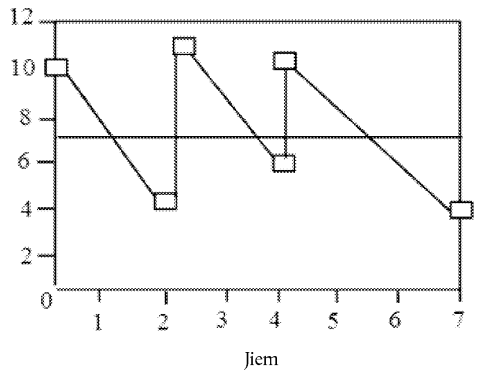
KALKOLU TAL-MEDJA PONDERATA GĦALL-ĦIN

Il-medja kkalkolata għall-ħin

Meta wieħed iqis li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test tul il-perjodu bejn it-tiġdidiet tal-medium, hemm bżonn li jiġi kkunsidrat liema konċentrazzjoni għandha tingħażel sabiex tirrappreżenta l-medda ta' konċentrazzjonijiet esperjenzati mid-*Daphnia* ġenituri. L-għażla għandha tkun ibbażata fuq kunsiderazzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll statistiċi. Pereżempju, jekk huwa maħsub li r-riproduzzjoni hija l-aktar milquta mill-konċentrażżjoni massima esperjenzata, allura għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni. Madankollu, jekk l-effett akkumulat jew l-effett aktar fit-tul tas-sustanza kimika tossika huwa kkunsidrat bħala aktar importanti, allura l-konċentrazzjoni medja hija aktar rilevanti. F'dan il-każ, ikun xieraq li tintuża medja tal-konċentrazzjoni ponderata għall-ħin, peress li din tqis il-varjazzjoni fil-konċentrazzjoni istantanja fuq medda ta' żmien.

Figura 1

Eżemoju tal-medja ponderata għall-ħin



Il-Figura 1 turi eżempju ta' test (simplifikat) li jdum sebat ijiem b'tiġdid tal-medium fil-Jiem 0, 2 u 4.

— Il-linja żigużajg irqiqa tirrappreżenta l-konċentrazzjoni fi kwalunkwe waqt. It-tnaqqis fil-konċentrazzjoni huwa supponut li jsegwi proċess ta' degradazzjoni esponenzjali.

— Is-6 punti pplottjati jirrappreżentaw il-konċentrazzjonijiet osservati mkejlin fil-bidu u fi tmiem kull perjodu ta' tiġdid.

— Il-linja solida u ħoxna tindika l-pożizzjoni tal-medja ponderata għall-ħin.

Il-medja ponderata għall-ħin hija kkalkolata b'tali mod li l-erja taħt il-medja ponderata għall-ħin tkun daqs l-erja taħt il-kurva ta' konċentrazzjoni. Il-kalkolu għall-eżempju ta' hawn fuq jintwera fit-Tabella 1.

Tabella 1

Kalkolu tal-Medja ponderata għall-ħin

Tiġdid Nru	Jiem	Konċ 0	Konċ 1	Ln(Konċ 0)	Ln(Konċ 1)	Erja
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼**M7**

Tiġdid Nru	Jiem	Konċ 0	Konċ 1	Ln(Konċ 0)	Ln(Konċ 1)	Erja
Jiem Totali:	7				Erja Totali:	50,092
					Medja tat-TW:	7,156

Jiem huwa n-numru ta' jiem fil-perjodu ta' tiġdid

Konċ 0 hija l-konċentrazzjoni mkejla fil-bidu ta' kull perjodu ta' tiġdid

Konċ 1 hija l-konċentrazzjoni mkejla fi tmiem kull perjodu ta' tiġdid

Ln(Konċ 0) hija l-logaritma naturali tal-Konċ 0

Ln(Konċ 1) hija l-logaritma naturali tal-Konċ 1

L-*erja* hija l-erja taħt il-kurva esponenzjali għal kull perjodu ta' tiġdid. Il-vijabbiltà hija kkalkolata bi:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Il-medja ponderata għall-ħin (*Medja tat-TW*) hija l-*Erja Totali* diviża bil-*Jiem Totali*.

Naturalment, għat-test tar-riproduzzjoni tad-*Daphnia*, it-tabella għandha tiġi estiża sabiex tkopri 21 jum.

Huwa ċar li meta jsiru osservazzjonijiet biss fil-bidu u fit-tmiem ta' kull perjodu ta' tiġdid, mhuwiex possibbli li jiġi kkonfermat li l-proċess ta' tħassir huwa, fil-fatt, esponenzali. Kurva differenti tirriżulta f'kalkolu differenti għall-Erja. Madankollu, il-proċess ta' degradazzjoni esponenzali huwa plawżibbli u aktarx li huwa l-aħjar kurva li tista' tintuża fin-nuqqas ta' aktar informazzjoni.

Madankollu, hemm bżonn li jsir xogħol bil-galbu jekk l-analiżi kimika tonqos milli ssib xi sustanza kimika fi tmiem il-perjodu ta' tiġdid. Kemm-il darba ma jkunx possibbli li ssir valutazzjoni ta' kemm is-sustanza kimika tisparixxi malajr mis-soluzzjoni, inkun impossibbli li tinkiseb erja realistika taħt il-kurva u għal-hekk ikun impossibbli li tinkiseb medja raġonevoli ponderata għall-ħin.

▼M7

Appendiċi 7

GWIDA GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TAS-SESS NEONAT

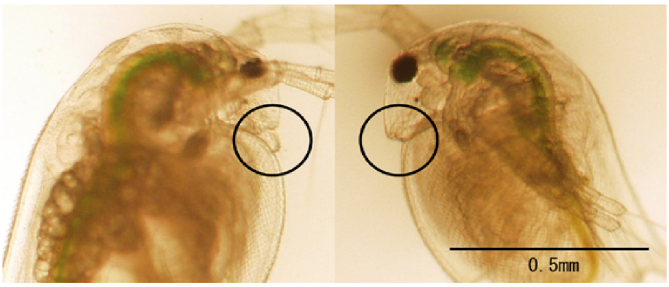
Il-produzzjoni ta' rġiel neonati tista' sseħħ f'kundizzjonijiet ambjentali li jinbidlu, bħal fotoperjodu li jiqsar, temperatura, konċentrazzjoni inqas ta' ikel, u densità tal-popolazzjoni li tiżdied (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). Il-produzzjoni ta' rġiel hija rispons magħruf għal ċerti regolaturi tat-tkabbir ta' insetti (Oda *et al*., 2005). F'kundizzjonijiet li fihom stressaturi kimiċi jkunu qegħdin jinduċu tnaqqis fin-nisel riproduttiv min-nisa partenoġeniċi, ikun mistenni numru ikbar ta' rġiel (OECD, 2008). Fuq il-bażi tal-informazzjoni disponibbli, mhuwiex possibbli li jitbassar liema mill-proporzjon tas-sess jew mill-punt ta' tmiem tar-riproduzzjoni sejjer ikun iktar sensittiv; madankollu, hemm indikazzjonijiet (referenza "rapport ta' validazzjoni", parti 1) li din iż-żieda fin-numru ta' rġiel tista' tkun inqas sensittiva miż-żieda fin-nisel. Peress li l-iskop primarju tal-metodu ta' ttestjar huwa li jivvaluta n-numru ta' nisel prodott, il-feġġa ta' rġiel hija osservazzjoni fakultattiva. Jekk dan il-punt ta' tmiem fakultattiv jiġi evalwat fi studju, għandu jintuża kriterju ta' validità addizzjonali tat-test ta' mhux iktar minn 5 % irġiel fil-kontrolli.

L-iktar mod prattiku u faċli kif jiġu differenzjati s-sessi tad-*Daphnia* huwa li jintużaw il-karatteristiċi fenotipiċi tagħhom, peress li l-irġiel u n-nisa huma ġenetikament l-istess u s-sess tagħhom jiġi stabbilit mill-ambjent. L-irġiel u n-nisa huma differenti fit-tul u fil-morfoloġija tal-ewwel antenni, li huma itwal fl-irġiel milli fin-nisa (Fig. 1). Din id-differenza tingħaraf mill-ewwel wara t-twelid, għad li jiżviluppaw karatteristiċi sesswali sekondarji oħrajn huma u jikbru (eż. ara l-Fig. 2 f'Olmstead and LeBlanc, 2000).

Sabiex jiġi osservat is-sess morfoloġiku, neonati prodotti minn kull annimal tat-test għandhom jiġu ttrasferiti b'pipetta u jitqiegħdu f'dixx petri bil-medium tat-test. Il-medium jinżamm għal minimu sabiex jiġi ristrett il-moviment tal-annimali. L-osservazzjoni tal-ewwel antenni tista' ssir taħt sterjomikroskopju (× 10-60).

Fig. 1

***D. magna* raġel (xellug) u mara (lemin) f'età ta' 24 siegħa. L-irġiel jistgħu jingħarfu minħabba t-tul u l-morfoloġija tal-ewwel antenni tagħhom meta mqabblin man-nisa, kif muri fiċ-ċrieki (Tatarazako *et al.*, 2004).**



REFERENZI

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

C.21. **MIKROORGANIŻMI TAL-ĦAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAN-NITROĠENU**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 216 (2000)

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-Metodu tat-Testijiet jiddiskrivi metodu tal-laboratorju iddisinjat sabiex jinvestiga l-effetti fit-tul ta' kimiċi, wara espożizzjoni waħda, dwar l-attività tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu fil-mikroorganiżmi tal-ħamrija It-test huwa prinċipalment ibbażat fuq ir-rakkommandazzjonijiet ta' l-Organizzazzjoni għall-Protezzjoni tal-Pjanti Ewropej u tal-Mediterran (1). B'dana kollu, Linji ta' Gwida oħrajn, inklużi dawk tal-Biologische Bundesanstalt tal-Ġermanja (2), il-US Environmental Protection Agency (3) il-SETAC (4) u International Organization for Standardization (ISO) (5), kienu wkoll meqjusa. Laqgħa ta' ħidma tal-OECD dwar is-Selezzjoni tal-ħamrija/sediment li kienet inżammet fi Belgirate, l-Italja, fil-1995 (6) qabel dwar in-numru u t-tipi tal-ħamrija għall-użu f'dan it-test. Rakkommandazzjonijiet dwar il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-kampjun tal-ħamrija huma ibbażati fus id-Dokument ta' Gwida ISO (7) u r-rakkommandazzjonijiet mil-Laqgħa ta' Ħidma ta' Beligrate. Fl-assaġġ u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tas-sustanzi tat-test, determinazzjoni ta' l-effetti fuq l-attività mikrobjali tal-ħamrija tista tkun meħtieġa, eż., meta l-informazzjoni dwar l-effetti potenzali min-naħa tal-protezzjoni tal-prodotti ta' l-uċuħ fuq il-mikroflora tal-ħamrija huma meħtieġa jew meta l-espożixxjoni ta' mikroorganiżmi tal-ħamrija lejn kimiċi apparti milli l-prodotti tal-protezzjoni tal-ħamrija, jkunu mistennija. It-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa mwettaq sabiex jiddetermina l-effetti ta' tali kimiċi fuq il-mikroflora tal-ħamrija. Jekk l-agrikimiċi (eż., il-prodotti talk-protezzjoni tal-ħamrija, l-fertilizzanti, u l-kimiċi tal-foresterija) huma ittestjati, kemm it-trasformazzjoni tan-nitroġenu u wkoll it-testijiet tat-trasformazzjoni tal-karbonu, huma mwettqa. Jekk dawk li ma humiex l-agrokimiċi huma ittestjati, it-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa suffiċjenti. B'dana kollu, jekk il-valuri EC5O tat-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu għal tali kimiċi jidħol fi ħdan il-medda miosjuba għal inibituri tan-nitrifikazzjoni kummerċjalment disponibbli (eż. nitrapyrin), test tat-trasformazzjoni tal-karbondu jista jkun imwettaq sabiex tkun akkwistata aktar informazzjoni.

Il-ħamrija tikkonsisti minn komponenti ħajjin u mhux-ħajjin li jeżistu f'taħlitiet kumplessi u eteroġenji. Il-mikroorganiżmi għandhom parti ta' rwol impoprtanti fit-tfarrik u t-traformazzjoni tal-meterja organika f'ħamrija fertili b'ħafna speċje jikkontribwixxu għal diversi aspetti tal-fertilià tal-ħamrija. Kwalunkwe interferenza fit-tul ma dawn il-proċessi biokimiċi jista jkollha l-potenzal li tinterferixxi maċ-ċiklu tan-nutrient u dan jista jibdel il-fertilità tal-ħamrija. It-trasformazzjoni tal-karbonju u n-nitroġenu isseħħ fil-ħamrija fertili kollha. Għalkemm il-kommunitajiet mikrobjali responsabbli għal dawn il-proċessi jiddifferixxu bejn ħamrija u oħra, il-mezzi tat-trasformazzjoni huma essenzalment l-istess.

Dan il-Metodu ta' Testijiet kif deskritt huwa iddisinjat sabiex jiżvela l-effetti ħżiena ta' terminu fit-tul ta' sustanza dwar il-proċess tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu f'ħamrija erobika tal-wiċċ. Dan il-Metodu tat-test jippermetti wkoll l-estimi ta' l-effetti tas-sustanzi fuq it-trasformazzjoni tal-karbonju mill-mikroflora tal-ħamrija. Il-formazzjoni tan-nitrat isseħħ sussegwentament għad-deġenerazzjoni tar-rabtiet karbonju-nitroġenu. Għalhekk, jekk rati egwali tal-produzzjoni tan-nitroġenu jkunu misjuba f'ħamrija ittrattata u tal-kontroll, dan huma ferm probabbli minħabba li l-passaġġi tad-degradazzjoni maġġura tal-karbonju huma intatti u funzjonali. Is-substrata magħżulha għat-test (tagħsida luċerna fi trab) għandha telattività favorevoli ta' karbonju u nitroġenu (normalment bejn 12/1 u 16/1). Minħabba dan, in-nuqqas ta' karbonju huma aġevolat matul it-test u jekk il-kommunitajiet mikrobjali huma bil = ħsara kinn xi kimika, dawn jistgħu jirkupraw fi żmien 100 jum.

▼B

It-testijiet li minnhoma dn il-metodu ta' testijiet kien ġie żviluppat kienu primarjament iddisinjati għal sustanzi li dwarhom l-ammont li jilħaq il-ħamrija setgħa jkun antiċipat. Dan hu l-każ, per eżempju, għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ li dwarhom ir-rata ta' l-applikazzjoni fl-għelieqi hija magħrufa. Għall-agrokimiki, it-testijiet ta' żewġ doži relevanti għar-rata antiċipata jew imbassra ta' l-applikazzjoni huma suffiċjenti. L-agrokimiċi jistgħu ikunu ittestjati bħala ingredjenti attivi (a.i.) jew prodotti formulati. B'dana kollu, it-test mhux limitat għall-agrokimiċi. Bit-tibdil kemm ta' l-ammonti tas-sustamnza tat-test applikata fil-ħamrija, u il-mod ta' kif l-informazzjoni hija evalwata, it-test jista wkoll ikunu użat għal kimiċi li dwarhom l-ammont mistenni li jilħaq il-ħamrija ma jkunx maghruf. Għalhekk, bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi, l-effetti ta' serje ta' konċentrazzjonijiet dwar it-trasformazzjoni tan-nitroġenu, huma determinati. L-informazzjoni minn dawn it-testijiet hija użata sabiex tipprepara il-kurva tad-doża-reazzjoni u tikkalkola il-valuri Ecx, meta x hija definita bħala % effett.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Trasformazzjoni tan-nitroġenu: Hija d-deghradazzjoni aħħarija mill-mikroorganiżmi tal-materja organika li jkun fiha n-nitroġenu, via l-proċess ta' l-ammonifikazzjoni u n-nitrifikazzjoni, lejn in-nitrat inorganiku tal-prodott finali rispettivament.

Ec_x (Konċentrazzjoni Effettiva): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija li tirriżulta f'xi persentaġġ inibizzjoni tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu lejn nitrat.

EC_{5O} (Konċentrazzjoni Effettiva Medjana): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija li tirriżulta fi 50 persentaġġ (50 %) inibizzjoni tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu lejn nitrat.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Ħamrija mgħarbla hija emendata ma tgħasida tal-pjanti li ssir trab u jew ittrattata bis-sustanza tat-test jew imħollija mhux ittrattata (kontroll). Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, minimu ta' żewġ konċentrazzjonijiet tat-test huma rakkommandati u dawn għandhom ikunu magħżula b'reazzjoni ma l-għola konċentrazzjoni antiċipata fl-għalqa. Wara 0, 7, 14-il jum u 28 jum ta' l-inkubazzjoni, kampjuni ta' ħamrija ittrattata u tal-kontroll huma estratti bis-solvent xieraq, u l-kwantitajiet ta' nitrat fl-estratti huma determinati. Ir-rata tal-formazzjoni tan-nitrat fil-kampjuni ittratti huwa paragunata mar-rata fil-Kontrolli, u d-fevjazzjoni perċentwali ta' dik ittrattata mill-kontrol hija ikkalkolata. It-testijiet kollha jkunu mill-anqas ta' 28 jum. Jekk, fit-28 jum, id-differenzi bejn il-ħamrija ittrattata u dik mhux ittrattata huma egwali jew akbar minn 25 %, il-kejl jitkompla sa massimu ta' 100 jum. Jekk agrokimiċi huma ittestjati, serje ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test huma miżjuda mal-kampjuni tal-ħamrija, u l-kwantitajiet tan-nitrat iffurmat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma mkejla wara 28 jum ta' inkubazzjoni. Ir-riżultati mit-testijiet b'konċentrazzjonijiet multipli huma analizzati bl-użu ta' mudell regressiv, u l-valuri Ecx huma ikkalkolati (i.e. EC_{50}, EC_{25} u/jew EC_{10}). Ara definizzjonijiet.

1.5. IL-VALIDITÀ TAT-TEST

L-evalwazzjonijiet tar-riżultati tat-test ma l-agrokimiċi huma bbażati fuq relattivament differenzi żgħar (i.e. medja ta' valur ± 25 %) bejn il-konċentrazzjonijiet nitriċi fil-ħamrija tal-kontroll u f'dik ittrattata, għalhekk varjazzjonijiet kbar fil-kontrolli jistgħu jwasslu għal riżultati foloz. Għalhekk, il-varjazzjoni bejn kampjunu mġedda tal-kontroll għandha tkun ta' anqas minn ± 15 %.

▼B

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Apparat**

Il-kontenituri tat-test użati huma magħmula minn materjal kemikament inert. Dawn għandhom ikunu ta' daqs xieraq b'konformità mal-proċedura użata għall-inkubazzjoni tal-ħamrija. i.e. l-inkubazzjoni fil-massa jew bħala serje individwai ta' kampjuni tal-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.7.1.2). Attenzjoni qawwija għandha tingħata sabiex ikun minimizzat it-telf ta' l-ilma u li jkun imħolli l-iskambju tal-gass matul it-test (eż. il-kontenituri tat-test jistgħu ikunu mogħttija b'folja tal-polyethylene mtaqqba). Meta jkunu ittestjati sustanzi volatili, kontenituri li jistgħu ikunu ssiġġilati u li ma jgħaddix gass minnhom għandhom ikunu wżati. Dawn għandhom ikunu ta' daqs li madwar kwart tal-volum tagħhom ikun mimli bil-kampjun tal-ħamrija.

Apparat normali tal-laboratorju, inkluż dan li ġej, huwa wżat:

— apparat ta' l-aġitazzjoni:: ċelċieka mekkanika jew apparat ekwivalenti;

— ċentrifuga (3 000 g) jew apparat tal-filtrazzjoni (bl-użu tal-karta tal-filtru ħielsa min-nitrat);

— strument ta' sensittivit adekwata u tar-riproduċċibbiltà għall-analiżi tan-nitrat.

1.6.2. **L-għażla u n-numu ta' ħamrija**

Ħamrija waħda hija użata. Il-karatteristiċi rakkommandati tal-ħamrija huma kif ġej:

— kontenut tar-ramel: Mhux inqas minn 50 % imma mhux iktar minn 75 %;

— pH: 5,5 - 7,5;

— kontenut tal-karbonju organiku: 0,5 – 1,5 %;

— il-biomassa mikrobjali għandha tkun imkejla (8)(9) u l-pkontenut tal-karbonju tagħha għandu jkun ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali tal-ħamrija.

F'bosta każi, ħamrija b'dawn il-karatteristiċi tirrapreżenta l-għar każ ta' sitwazzjoni, la darba l-adsorbazzjoni tal-kimika tat-test hija l-minimu u d-disponnabbiltà tagħha lejn il-mikroflora hija l-massimu. B'konsegwenza, it-testijiet b'ħamrija oħra huma, ġeneralemnt, mhux meħtieġa. B'dana kollu, f'ċerti ċirkostanzi, eż. meta l-użu maġġuri antiċipat tas-sustanza tat-test f'ħamrija partikolari, bħal ma huma l-ħamrija aċiduża tal-foresti, jew għal kimiċi ikkargati elettrostatikament, jista jkun meħtieġ li tintuża ħamrija addizzjonali.

▼B

1.6.3. **Il-ġbir u l-ħażna tal-kampjunu tal-ħamrija**

1.6.3.1. *Il-ġbir*

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-għalqa minn fejn il-ħamrija tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġetali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, żidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Is-sit magħżul għall-ġbir tal-ħamrija għandu jkun wieħed li jippermetti użu f'terminu twil. Mergħat permanenti, għelieqi b'uċuħ annwali taċ-ċereali (apparti mill-qamħ-ir-rum) jew dawk moghtija d-demel b'żergħat iffullata, huma tajbin. Il-għażla tas-sit tal-kampjunar m'għandhiex tkun ġiet trattata bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ għam mill-anqas sena qabel il-kampjunar. Ukoll, l-ebda fertilizzant organiku ma jkun ġie applikat għal mill-anqas sitt xhur. L-użu ta' fertilizzant minerali huwa aċċettabbli biss meta, b'konformità mal-ħtiġiet tal-kampjuni ta' l-uċuħ u tal-ħamrija, m'għandhomx ikunu miġbura għal mill-anqas tlett xhur wara l-applikazzjoni tal-fertilizzant. L-użu ta' ħamrija trattata bil-fertilizzanti li għandhom effetti bijoċidali magħrufa (eż. is-sijanamid tal-kalċju) għandu jkun evitat.

Il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (itwal minn 30 jum) ta' nixfa jew ta' stgħadir bl-ilma. Għal ħamrija maħruta, il-kampjuni għandhom jinġabru minn fond ta' 1 sa 20 cm l-isfel. Għall art tal-mergħa (art fil-ħaxix) jew ħamrija oħra meta l-ħrit ma jseħħx matul perijodi twal (f'mill-anqas staġun wieħed tat-tkabbir), il-fond massimu tal-kampjunar jista jkun kemm xejn aktar minn 20 cm (eż. sa 25 cm).

Il-kampjuni tal-ħamrija għandhom ikunu trasportati bl-użu ta' kontenituri u skond kondizzjonijiet tat-temperatura li jiggarantixxu li l-propjetajiet inizjali tal-ħamrija ma jkunux sinifikament mibdula.

1.6.3.2. *Ħażna*

L-użu ta' ħamrija miġbura friska mill-għelieqi huwa ippreferut. Jekk ħażna fil-laboratorju ma tistgħax tkun evitata, il-ħamrija tista tkun maħżuna fid-dlam 4 ± 2 °C għal massimu ta' tlett xhur. Matul il-ħażna tal-ħamrija, il-kondizzjonijiet erobiċi għandhom ikunu assigurati. Jekk il-ħamrija tkun miġbura minn żoni ta' fejn din tkun iffriżata għal mill-anqas tlett xhur tas-sena, il-ħażna għal sitt xhur fi – 18 °C sa – 22 °C tista tkun ikkonsidrata. Il-biomassa mikrobjali tal-ħamrija maħżuna hija mkejla qabel kull esperiment u l-karbonju fil-biomassa għandu jkun mill-anqas 1 % tal-kontenut totali tal-karbonju organiku fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.2).

1.6.4. **Tqandil u l-Preparazzjoni tal-HAmrija għat-Test**

1.6.4.1. *Preinkubazzjoni*

Jekk il-ħamrija kienet maħżunha (ara s-sezzjoni 1.6.3.2), preinkubazzjoni hija rakkommandata għal perijodu ta' bejn 2 u 28 jum. It-temperatura u l-umidità tal-kontenut tal-ħamrija matul il-preinkubazzjoni għandhom ikunu simili għal dik użata fit-test (ara s-sezzjonijiet 1.6.4.2 u 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Karatteristiċi fiżiko-kimiċi*

Il-ħamrija hija manwalment imnaddfa minn oġġeti kbar (eż. ġebel, partijiet ta' pjanti, eċċ.) u imbagħad magħrbla fin-nieda mingħajt tnixxif eċċessiv lejn daqs ta' partiċelli ta' anqas minn jew egwali għal 2 mm. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kampjun tal-ħamrija għandu jkun aġġustat b'ilma distillat jew dejonizzat lejn valur ta' bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma.

1.6.4.3 *Amendi b'substrata organika*

Il-ħamrija għandha tkun emendata b'substrata organika xierqa, eż. tgħasida mrammla luċerna-ħaxix-ħadranija (il-komponent ewlieni: Medicago sativa) b'relattività C/N ta' bejn 12/1 u 16/1. Ir-relattività rakkommandata tal-ħamrija luċerna hija ta' 5 g luċern kull kilogramma ta' ħamrija (piz xott).

1.6.5. **Preparazzjoni tas-sustanza tat-test għall-applikazzjoni mal-ħamrija**

Is-sustanza tat-test hija normalment applikata bl-użu ta' trasportatur. It-trasportatur jista jkun ilma (għal sustanzi li jinħallu fl-ilma) jew solidu inert bħal ma huwa ramel fin tal-kwartz (daqs tal-partiċella: 0,1 - 0,5 mm). Trasportaturi likwidi apparti mill-ilma (eż. solventi organiċi bħal ma huma l-aċetun, il-kloroforma) għandhom ikunu evitati la darba dawn jistgħu joħolqu ħsara għall-mikroflora. Jekk ir-ramel ikunu użat bħala trasportatur, dan jista jkun m iksi bis-sustanza tat-test imdewba jew sospiża f'solvent xieraq. F'tali każi, is-solvent għandu jkun imneħħi bl-evaporazzjoni qabel it-taħlit mal-ħamrija. Għall-aħjar distribuzzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija, relattività ta' 10 g ramel ma kull kilogramma ta' ħamrija (piż xott) huwa rakkommandabbli. Kampjuni tal-kontroll huma ittrattati b'ammont ekwivalenti ta' ilmaa u/jew ramel kwartz biss.

Meta jkunu ittestjati kemikali volatili, it-telf matul it-trattament għandu jkun evitat sa kemm dan ikun possibbli u tentattiv għandu jsir sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja fil-ħamrija (eż. is-sustanza tat-test għandha tkun injettata fil-ħamrija minn diversi postijiet).

1.6.6. **Konċentrazzjonijiet tat-test**

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas żewġ konċentrazzjonijiet għandhom ikunu wżati. Il-konċentrazzjoni l-baxxa għandha tirrifletti mill-anqas l-ammont massimu mistenni li jilħaq il-ħamrija waqt kondizzjonijiet prattiċi, fil-waqt li l-konċentrazzjoni l-għolja għandha tkun mutiplu tal-konċentrazzjoni l-baxxa. Il-konċentrazzjonijiet ta' sustanza tat-test miżjuda mal-ħamrija huma kkalkolati billi tkun preżunta inkorporazzjoni uniformi sa fond ta' 5 cm u l-massa tal-ħamrija f'densità ta' 1.5. Għall-agrokimiċi li huma applikati direttament mal-ħamrija, jew għal kimiċi li dwarhom il-kwantità li tilħaq il-ħamrija tista tkun prevista, il-konċentrazzjonijiet tat-test irrakkommandati huma l-massimu Predicted Environmental Concentration (PEC) (Konċentrazzjoni Ambjentali Mbassra) u ħames darbiet dik il-konċentrazzjoni. Is-sustanzi li huma mistennija li jkunu applikati diversi drabi mal-ħamrija fi staġun wieħed għandhom ikunu ittestjati fil-konċemntrazzjonijiet derivati mill-multiplikazzjoni tal-PEC bin-numru massimu antiċipat ta' l-applikazzjonijiet. L-għoila konċentrazzjoni ittestjata, b'dana kollu, m'għandhiex teċċedi għaxar darbiet il-massimu tar-rata ta' applikazzjoni waħda. Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, serje ġeometrikuta' mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet għandu jkun użat. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda meħtieġa tal-valuri EC_x.

▼B

1.7. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.7.1. **Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.7.1.1. *It-trattament u l-kontrol*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża fi tlett porzjonijiet ta' piż egwali. Żewġ porzjonijiet huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih il-prodott, u l-ieħor huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-prodott (kontroll). Minimu ta' tliet repliki kemm għall-ħamrija ittrattata u wkol mhux ittrattata huma rakkommandati. Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża f'sitt porzjonijiet ta' piż egwali. Ħamsa mill-kampjunu huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih is-sustanza tat-test, u s-sitt kampjun huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-kimika. Tlett replikati taż-żewġ trattamenti u tal-kontroll huma rakkommandati. Attenzjoni għandha tingħata sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja tas-sustanza tat-test fil-kampjunu tal-ħamrija ittrattata. Matul it-taħlit, l-ikkumpattjar jew gerbubi mgħaqqda għandhom ikunu evitati.

1.7.1.2. *L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija*

L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija tista titwettaq b'żewġ modi: Bħala kampjuni fil-massa ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata jew f'serje ta' sub-kampjuni individwali u ta' daqs egwali ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata. B'dana kollu, meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali. Meta l-ħamrija tkun inkubata fil-massa, kwantitajiet kbar ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata huma ippreparati u s-sub-kampjuni għall-analiżi huma miġbura kif meħtieġ matul it-test. L-ammont inizjalment ippreparat għal kull trattament u kontroll jiddependi mid-daqs tas-sub-kampjuni, in-numru ta' repliki użati għall-analiżi u n-numru massimu antiċipat tad-drabi tal-kampjunar. Il-ħamrija inkubata fil-massa għamndha tkun imħallta sewwa qabel is-sub-kampjuni. Meta l-ħamrija hija inkubata f'serje individwali ta' ħamrija, kull ħamrija ittrattata jew mhux trattata fil-massa hija diviża fin-numru meħtieġ ta' sub-kampjuni, u dawn huma utilizzati kif meħtieġ. Fl-esperimenti ta' meta tnejn jew aktar ħinijiet tal-kampjunar jistgħu ikunu antiċipati, sub-kampjuni biż-żejjed għandhom ikunu ippreparati sabiex ikun hemm abbastanza għar-replikati kollha u d-drabi tal-kampjunar kollu. Mill-anqas tlett kampjuni tar-replikati tal-ħamrija tat-test għandhom ikunu inkubati permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi (ara s-sezzjoni 1.7.1.1). Matul it-testijiet kollha, kontenituri xierqa, bi spazju fil-wiċċ suffiċjenti, għandhom ikunu użati sabiex ikunu evitati l-kondizzjonijiet anerobiċi. Meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali.

1.7.1.3. *Il-kondizzjonijiet u t-tul tat-testijiet*

It-test huwa mwettaq fid-dlam f'temepratura tal-kamra ta' 20 ± 2 °C. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kamjuni tal-ħamrija għandu jkun miżmum matul it-test għal bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.4.2) b'medda ta' ± 5 %. Ilma distillat jew deonizzat jista jkun miżjud kif meħtieġ.

It-tul minimu tat-testijiet huwa 28 jum. Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, ir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma mqabbla. Jekk dawn ikunu differenti b'aktar minn 25 % fil-jum 28, it-test jitkompla sakemm differenza egwali għal, jew anqas minn 25 % tkun akkwistata, jew għal massimu ta' 100 jum, liema minnhom ikun l-aqsar. Għal dawk li ma humiex agrokimiċi, it-test ikun terminat wara 28 jum. Fil-jum 28, il-kwantitajiet tan-nitrat fil-kampjuni tal-ħamrija ittrattata jew tal-kontroll huma determinati u l-valuri EC_x ikunu ikkalkolati.

▼B

1.7.2. **Kampġjunaar u analiżi tal-ħamrija**

1.7.2.1. *Kampjunar skedat tal-ħamrija*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-kampjuni tal-ħamrija huma analiżżati għan-nitrat fil-jiem 0, 7, 14 u 28. jekk test imtawwal ikun meħtieġ, aktar kejl għandu jseħħ f'intervalli ta' 14-il jum, wara l-jum 28.

Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test huma wżati u l-kampjuni tal-ħamrija huma analiżżati għan-nitrat fil-bidu (jum 0) u fit-tmiem tal-perijodu ta' l-espożizzjoni (28 jum). Kejl intermedju, eż. fil-jum 7, jista jkun miżjud jekk dan ikun meqjus bħala meħtieġ. L-informazzjoni akkwistata fil-jum 28 hija użata għad-determinazzjoni tal-valux EC_x dwar il-kimika. Jekk mixtieq, l-informazzjoni mill-jum 0 tal-kampjuni tal-kontroll jistgħu ikunu wżati sabiex jirraportaw il-kwanititá inizjali tan-nitrat fil-ħamrija.

1.7.2.2. *L-analiżi tal-kampjuni tal-ħamrija*

L-ammont ta' nitrat iffurmat f'kull replika trattata jew tal-kontroll huwa determinat f'kull waqt tal-kampjunar. In-nitrat huwa estratt mill-ħamrija biċ-ċekċik tal-kampjun b'solvent xieraq ta' l-estrazzjoni, eż. taħlita ta' 0,1 M klorid tal-putassa. Relattività ta' 5 ml tat-taħlita KC1 kull gramma piż xott ekwivalenti tal-ħamrija huwa rakkommandat. Sabiex tkun imtejba l-estrazzjoni, il-kontenituri li jkunu bil-ħamrija u t-taħlita ta' l-estrazzjoni m'għandhomx ikunu aktar minn nofshom mimlija. It-taħlitiet huma mċekċka fi 150 rpm għal 60 minuta. It-taħlitiet ikunu ċentrifugati jew filtrati u l-fażijiet likwidi huma analiżżati għan-nitrat. Estratti likwisi ħielsa minn partiċelli jistgħu ikunu maħżuna qabel l-analiżi fi - 20 ± 5 °C sa sitt xhur.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'agrokimiċi, il-kwalità yan-nitrat iffurmat f'kull replika tal-kampjun tal-ħamrija għandha tkun irreġistrata, u l-valuri medji tar-replikati kollha għandhom ikunu ipprovduti f'għamla tabulari. Ir-rati tat-trasformazzjoni tan-nbitroġenu għandhom ikunu evalwati b'metodi xierqa u ġeneralment aċċettabbli (eż. Test-F, 5 % livell sinifikanti). Il-kwantitajiet ta' nitrat iffurmat huma espressi fi mg nitrat/kg piż xott tal-ħamrija/kull jum. Ir-rata tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull trattament hija mqabbla ma dik tal-kontroll, u l-persentaġġ tad-devjazzjoni mill-kontroll hija ikkaalkolata.

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'dawk li ma humiex agrokimiċi, il-kantità ta' nitrat iffurmat f'kull replika huwa determinat, u l-kurva doża-reazzjoni hija ippreparata għall-estimi tal-valuri EC_x. Il-kwantitajiet ta' nitrat (i.e. mg nitrat.kg piż xottv tal-ħamrija) misjuba fil-kampjuni ittrattati wara 28 jum huma mqabbla ma' dak misjun fil-kontroll. Minn din l-informazzjoni, il- % tal-valuri ta' l-inibizzjoni għal kull konċentrazzjoni tat-test huma ikkalkolati.Dawn il-persentaġġi huma mpinġija kontra l-konċentrazzjoni, u l-proċeduri statistiċi huma mbagħad użati għall-kalkolu tal-valuri EC_x. Limiti ta' l-affidabbilità (p = 0,95) għal ECx ikkalkolati huma wkoll determinati bl-użu tal-proċeduri normali (10) (11) (12).

Is-sustanzi tat-test li jkollhom kwantitajiet għoljin ta' nitroġenu jistgħu jikkontribwixxu għall-kwantitajiet ta' nitrat iffurmat matul it-test. Jekk dawn is-sustanzi huma ttestjati f'konċentrazzjoni għolja (eż. kimika li hija mistennija li tkun użata f'applikazzjonijiet repetuti) kontrolli xierqa għandhom ikunu inklużi fit-test (i.e. il-ħamrija flimkien mas-sustanza tat-test imma mingħajr it-tgħasida tal-pjanti). Dettalji minn dawn il-kontrolli għandhom ikunu nklużi fil-kalkoli tal- EC_x.

▼B

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Meta r-riżultati mit-testijiet bl-agrokimiċi huma evalwati, u d-differenza fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat bejn it-trattament baxx (i.e. il-massimu tal-konċentrazzjoni prevista) u l-kontroll tkun egwali għal, jew anqas minn 25 % fi kwalunkwe kampjun fil-waqt wara l-jum 28, il-prodott jista jkun evalwat bħala li jkollu infuwenza f'terminu fit-tul fuq it-trasformazzjoni tan-nitroġenu fil-ħamrija. Meta r-riżultati mit-testijiet bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi huma evalwatim il-valuri EC_{50}, EC_{25} u/jew EC_{10} huma wżati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Identifikazzjoni sġiġa tal-ġamrija użata, inkluż:

— referenza ġeografika tas-sit (latitudini, lonġitudini);

— informazzjoni dwar l-istorja tas-sit (i.e. il-koperta veġittiva, it-trattamenti bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ, trattamenti bil-fertilizzanti, kontaminazzjoni aċċidentali, eċċ.);

— is-sekwenza ta' l-użu (eż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.);

— il-fond tal-kampjunar (cm);

— il-kontenut ramel/ħama'/tafal (% tal-piż);

— pH (fl-ilma);

— kontenut tal-karbonju organiku (% piż xott);

— kontenut tan-nitroġenu organiku (% piż xott);

— il-konċentrazzjoni inizjali tan-nitrat (mg nitrat kg piż xott);

— kapaċità ta' l-iskambju tal-jonju (mmol/kg);

— biomassa mikrobjali f'termini ta' persentaġġ tal-karbonju organiku totali;

— referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru;

— l-informazzjoni li tirrigwardja il-ġbir u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija;

— Is-sustanza tat-test:

dettalji tal-pri-inkubazzjoni tal-ħamrija, jekk ikun hemm.

— in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;

— l-informazzjoni ta' l-identifikazzjoni kimika, meta relevanti, inkluża l-formula strutturali, il-purità (i.e. għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ il-persentaġġ ta' l-ingredjent attiv), il-kontenut tan-nitroġenu.

Substrata:

— is-sorsi tas-*substrata*

— il-komposizzjoni (i.e. tgħasida luċerna, it-tgħasida luċerna-ħaxixħdura);

— kontenut tal-karbonju u tan-nitroġenu (% piż xott);

— id-daqs ta' l-imgħarbel (mm).

▼B

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji ta' l-emenda tal-ħamrija b'*substrata* organika;

— in-numru tal-konċentrazzjonijiet fil-kimika tat-test użata u, meta xieraq, ġustifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet magħżula;

— dettalji ta' l-applikazzjoni tas-*substrata* tat-test fil-ħamrija;

— temperatura ta' l-inkubazzjoni;

— il-kontenut ta' l-umidità fil-bidu u matul it-test;

— il-metodu użat ta' l-inkubazzjoni tal-ħamrija (i.e. bħala massa jew bħala serje ta' subkampjuni individwali);

— in-numru ta' replikati;

— id-drabi tal-kampjuna;

— Riżultati:

il-metodu użat għall-estrazzjoni tan-nitrat mill-ħamrija.

— proċedura analitika u l-apparat użat fl-analiżi tan-nitrat;

— dettalji tabulati, inklużi il-valuri individwali u medji għall-kejl tan-nitrat;

— il-varjazzjoni bejn ir-replikati fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll;

— spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet imwettqa fil-kalkoli, jekk relevanti;

— il-varjazzjoni perċentwali fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull waqt tal- kampjunar, jekk xieraq, il-limitu ta' l-affidibbilità tal-valur EC_{50} b'95 fil-mijja affidibbilità, EC_x oħrajn (i.e. EC_{25} jew EC_{10}) b'intervalli ta' l-affidibbilità, u grafika tal-kurva doża-reazzjoni;

— riżultati statitiċi tat-trattament;

— l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jkunu ta' għajnuna fl- interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality – Biological Methods.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18-20 janvier 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass -Part 1: Substrateinduced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass -Part 2: Fumigationextraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New - York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. **MIKROORGANIŻMI TAL-ĦAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAL-KARBONJU**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 217 (2000)

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-Metodu tat-testijiet jiddeskrivi metodu tal-laboratorju iddisnjat sabiex jinvestiga l-effetti potenzjoni f'terminu fit-tul ta' espożizzjoni singola tal-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ u possibbilment kemikali oħrajn fuq l-attività tat-trasformazzjoni tal-karbomnju f'mikroorgaiżmi tal-ħamrija. It-test huwa prinċipalment ibbażat fuq ir-rakkommandazzjonijiet ta' l-Organizzazzjoni għall-Protezzjoni tal-Pjanti Ewropej u tal-Mediterran (1). B'dana kollu, Linji ta' Gwida oħrajn, inklużi dawk tal-Biologische Bundesanstalt tal-Ġermanja (2), il-US Environmental Protection Agency (3) il-SETAC (4), kienu wkoll meqjusa. Laqgħa ta' Ħidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Ħamrija/Sediment li nżammet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (5) qablet dwar in-numru u t-tip ta' ħamrija għall-użu f'dan it-test. Rakkommandazzjonijiet għall-ġbir, tqandil u l-ħażna tal-kampjun tal-ħamrija huma ibbażai fuq Dokument ta' Gwida ISO (6) u r-rakkomandazzjonijiet tal-Laqgħa ta' Ħidma ta' Belgirate.

Fl-assaġġ u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tas-sustanzi tat-test, determinazzjoni ta' l-effetti fuq l-attività mikrobjali tal-ħamrija tista tkun meħtieġa, eż., meta l-informazzjoni dwar l-effetti potenzjali min-naħa tal-protezzjoni tal-prodotti ta' l-uċuħ fuq il-mikroflora tal-ħamrija huma meħtieġa jew meta l-espożizzjoni ta' mikroorganiżmi tal-ħamrija lejn kimiċi apparti milli l-prodotti tal-protezzjoni tal-ħamrija, jkunu mistennija. It-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa mwettaq sabiex jiddetermina l-effetti ta' tali kimiċi fuq il-mikroflora tal-ħamrija. Jekk l-agrikimiċi (eż., il-prodotti tal-protezzjoni tal-ħamrija, l-fertilizzanti, u l-kimiċi tal-foresterija) huma ittestjati, kemm it-trasformazzjoni tan-nitroġenu u wkoll it-testijiet tat-trasformazzjoni tal-karbonu, huma mwettqa. Jekk dawk li ma humiex l-agrokimiċi huma ittestjati, it-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa suffiċjenti. B'dana kollu, jekk il-valuri EC5O tat-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu għal tali kimiċi jidħol fi ħdan il-medda misjuba għal inibituri tan-nitrifikazzjoni kummerċjalment disponibbli (eż. nitrapyrin), test tat-trasformazzjoni tal-karbondu jista jkun imwettaq sabiex tkun akkwistata aktar informazzjoni.

Il-ħamrija tikkonsisti minn komponenti ħajjin u mhux-ħajjin li jeżistu f'taħlitiet kumplessi u eteroġenji. Il-mikroorganiżmi għandhom parti ta' rwol impoprtanti fit-tfarrik u t- traformazzjoni tal-meterja organika f'ħamrija fertili b'ħafna speċi jikkontribwixxu għal diversi aspetti tal-fertilità tal-ħamrija. Kwalunkwe interferenza fit-tul ma' dawn il-proċessi bijokimiċi jista' jkollha l-potenzal li tinterferixxi maċ-ċiklu tan-nutrient u dan jista jibdel il-fertilità tal-ħamrija. It-trasformazzjoni tal-karbonju u n-nitroġenu sseħħ fil-ħamrija fertili kollha. Għalkemm il-kommunitajiet mikrobjali responsabbli għal dawn il-proċessi jiddifferixxu bejn ħamrija u oħra, il-mezzi tat-trasformazzjoni huma essenzjalment l-istess.

▼B

Dan il-Metodu ta' Testijiet kif deskritt huwa iddisinjat sabiex jiżvela l-effetti ħżiena ta' terminu fit-tul ta' sustanza dwar il-proċess tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu f'ħamrija erobika tal-wiċċ. It-test huwa sensittiv għal kambju fid-daqs u l-attività tal-kommunitajiet mikrobjali responsabbli għat-trasformazzjoni tal-karbonju la darba jissuġġetti dawn il-kommunitajiet kemm lejn l-impenn kemikali u wkoll għal nuqqas gravi ta' karbonju. Ħamrija mramma baxxa f'materja organika hija użata. Din il-ħamrija hija ittrattata bis-sustanza tat-test u inkubata permezz tal-kondizzjonijiet li jippermettu matabolizmu mikrobjali mħaffef. Permezz ta' dawn il-kondizzjonijiet, sorsi ta' karbonju faċilment disponibbli fil-ħamrija huma malajr eżawriti. Dan jikkaġuna skarzezza tal-karbonju li kemm jiqtol iċ-ċelloli mikrobjali u wkoll jinduċi rqad u/jew sporlazzjoni. Jekk it-test ikun imwettaq għal aktar minn 28 jum, is-somma ta' dawn ir-reazzjonijiet tista tkun imkejla bi (ħamrija mhux trattata) kontrolli bħala telf progressiv tal-biomassa mikrobjali metabolikament attiva (7). Jekk il-biomassa tal-ħammrija mċaħħda mill-karbonju, skond il-kondizzjonijiet tat-test, hija affettwata bil-preżenza ta' kimika, jista jkun il-każ li din ma terġal lura lejn l-istess livell bħal fil-kontroll. Għalhekk, disturnazi ikkaġunati bis-sustanza tat-test fi kwalunkwe hin matul it-test ta' spiss iddum sat-tmiem tat-test.

It-testijiet li minnhom dan il-metodu ta' testijiet kien ġie żviluppat kienu primarjament iddisinjati għal sustanzi li dwarhom l-ammont li jilħaq il-ħamrija setgħa jkun antiċipat. Dan hu l-każ, per eżempju, għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ li dwarhom ir-rata ta' l-applikazzjoni fl-għelieqi hija magħrufa. Għall-agrokimiki, it-testijiet ta' żewġ dożi relevanti għar-rata antiċipata jew imbassra ta' l-applikazzjoni huma suffiċjenti. L-agrokimiċi jistgħu ikunu ittestjati bħala ingredjenti attivi (a.i.) jew prodotti formulati. B'dana kollu, it-test mhux limitat għall-kimiċi b'konċentrazzjonijiet ambjentali prevedibbli. Bit-tibdil kemm ta' l-ammonti tas-sustamnza tat-test applikata fil-ħamrija, u l-mod ta' kif l-informazzjoni hija evalwata, it-test jista wkoll ikunu wżat għal kimiċi li dwarhom l-ammont mistenni li jilħaq il-ħamrija ma jkunx maghruf. Għalhekk, bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi, l-effetti ta' serje ta' konċentrazzjonijiet dwar it-trasformazzjoni tal-karbonju, huma determinati. L-informazzjoni minn dawn it-testijiet hija użata sabiex tipprepara l-kurva tad-doża-reazzjoni u tikkalkola l-valuri Ec_x, meta hija definita bħala % effett.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Trasformazzjoni tal-karbonju: Hija d-degradazzjoni minn mikroorganiżmi ta' materja organika li tifforma il-prodott aħħari inorganiku tad-diossidu tal-karbonju.

EC_x (Konċentrazzjoni Effettiva): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija li tirriżulta fi x persentaġġ inibizzjoni tat-trasformazzjoni tal-karbonju lejn diossidu tal-karbonju.

EC_{5O} (Konċentrazzjoni Effettiva Medjana): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija li tirriżulta fi 50 fil-mijja inibizzjoni tat-trasformazzjoni tal-karbonju lejn diossidu tal-karbonju.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn

▼B

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-ħamrija magħrbla hija jew ittrattata bis-sustanza tat-test jew imħollija mhux ittrattata (kontroll). Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, minimu ta' żewġ konċentrazzjonijiet tat-test huma rakkommandati u dawn għandhom ikunu magħżula b'reazzjoni ma l-għola konċentrazzjoni antiċipata fl-għalqa. Wara 0, 7, 14 u 28 jum ta' inkubazzjoni, kampjuni ta' ħamrija ittrattata u tal-kontroll huma mħallta bil-glukożju, u r-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju huma mkejla għal 12-il siegħa konsekuttivi. Ir-rate tar-respirazzjoni huma espressi bħala diossidu tal-karbonju rilaxxat (mg diossidu tal-karbonju/kd ħamrija xotta/fis-siegħa) jew ossiġenu ikkunsmat (mg ossiġenu/kg ħamrija/siegħa). Ir-rata medja tar-respirazzjoni fil-kampjuni tal-ħamrija ittrattata hima mqabbla ma dik fil-kontroll u d-devjazzjoni perċentwali tal-ħamrija ittrattata minn dik tal-kontroll hija ikkalkolata. It-testijiet kollha jkunu mill-anqas ta' 28 jum. Jekk, fit-28 jum, id-differenzi bejn il-ħamrija ittrattata u dik mhux ittrattata huma egwali jew akbar minn 25 %, il-kejl jitkompla sa massimu ta' 100 jum. Jekk kimiċi oħrajn apparti milli l-agrokimiċi huma ittestjati, serje ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test huma miżjuda mal-kampjuni tal-ħamrija, u r-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju (i.e. il-medja tal-kwantitajiet tad-diossidu tal-karbonju iffurmat jew l-ossiġenu ikkunsm, at) huma imkejja wara 28 jum. Ir-riżultati mit-testijiet b'konċentrazzjonijiet multipli huma analizzati bl-użu ta' mudell regressiv, u l-valuri Ec_x huma kkalkolati (i.e. EC_{50}, EC_{25} u/jew EC_{10}). Ara definizzjonijiet.

1.5. IL-VALIDITÀ TAT-TEST

L-evalwazzjonijiet tar-riżultati tat-test ma l-agrokimiċi huma bbażati fuq relattivament differenzi żgħar (i.e. medja ta' valur ± 25 %) bejn il-konċentrazzjonijiet nitriċi fil-ħamrija tal-kontroll u f'dik ittrattata, għalhekk varjazzjonijiet kbar fil-kontrolli jistgħu iwasslu għal riżultati foloz. Għalhekk, il-varjazzjoni bejn kampjuni mġedda tal-kontroll għandha tkun ta' anqas minn ± 15 %.

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Apparat**

Il-kontenituri tat-test użati huma magħmula minn materjal kemikament inert. Dawn għandhom ikunu ta' daqs xieraq b'konformità mal-proċedura użata għall-inkubazzjoni tal-ħamrija. i.e. l-inkubazzjoni fil-massa jew bħala serje individwai ta' kampjuni tal-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.7.1.2). Attenzjoni qawwija għandha tingħata sabiex ikun minimizzat it-telf ta' l-ilma u li jkun imħolli l-iskambu tal-gass matul it-test (eż. il-kontenituri tat-test jistgħu ikunu mogħttija b'folja tal-polyethylene mtaqqba). Meta jkunu ittestjati sustanzi volatili, kontenituri li jitgħu ikunu issiġġillati u li ma jgħaddix gass minnhom għandhom ikunu wżati. Dawn għandhom ikunu ta' daqs li madwar kwart tal-volum tagħhom ikun mimli bil-kampjun tal-ħamrija.

Għad-determinazzjoni tar-respirazzjoni indotta mill-glukożju, sistemi ta' inkubazzjoni u strumenti għall-kejl tal-produzzjoni tad-diossidu tal-karbonju jew tal-konsum ta' l-ossiġenu huma meħtieġa. Eżempji ta' tali sistemi u strumenti huma misjuba fil-letteratura (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **L-għażla u n-numu ta' ħamrija**

Ħamrija waħda hija użata. Il-karatteristiċi rakkommandati tal-ħamrija huma kif ġej:

— kontenut tar-ramel: Mhux inqas minn 50 % imma mhux iktar minn 75 %.

▼B

— pH: 5,5-7,5;

— kontenut tal-karbonju organiku: 0,5-1,5 %;

— il-biomassa mikrobjali għandha tkun imkejla (12)(13) u l-pkontenut tal- karbonju tagħha għandu jkun ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali tal- ħamrija.

F'bosta każi, ħamrija b'dawn il-karatteristiċi tirrapreżenta l-għar każ ta' sitwazzjoni, la darba l-adsorbazzjoni tal-kimika tat-test hija l-minimu u d-disponnabbiltà tagħha lejn il-mikroflora hija l-massimu. B'konsehwenza, it-testijiet b'ħamrija oħra huma, ġeneralemnt, mhux meħtieġa. B'dana kollu, f'ċerti ċirkostanzi, eż. meta l-użu maġġuri antiċipat tas- sustanza tat-test f'ħamrija partikolari, bħal ma huma l-ħamrija aċiduża tal-foresti, jew għal kimiċi ikkargati elettrostatikament, jista jkun meħtieġ li tintuża ħamrija addizzjonali.

1.6.3. **Il-ġbir u l-ħażna tal-kampjunu tal-ħamrija**

1.6.3.1. *Il-ġbir*

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-għalqa minn fejn il-ħamrija tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġitali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, żidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Is-sit magħżul għall-ġbir tal-ħamrija għandu jkun wieħed li jippermetti użu f'terminu twil. Mergħat permanenti, għelieqi b'uċuħ annwali taċ-ċereali (apparti mill-qamħ-ir-rum) jew dawk moghtija d-demel b'żergħat iffullata, huma tajbin. Il-għażla tas-sit tal-kampjunar m'għandhiex tkun ġiet trattata bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ għam mill-anqas sena qabel il-kampjunar. Ukoll, l-ebda fertilizzant organiku ma jkun ġie applikat għal mill-anqas sitt xhur. L-użu ta' fertilizzant minerali huwa aċċettabbli biss meta, b'konformità mal-ħtiġiet tal-kampjuni ta' l-uċuħ u tal-ħamrija, m'għandhomx ikunu miġbura għal mill-anqas tlett xhur wara l-applikazzjoni tal-fertilizzant. L-użu ta' ħamrija trattata bil-fertilizzanti li għandhom effetti bioċidali magħrufa (eż. is-sijanamid tal-kalċju) għandu jkun evitat.

Il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (itwal minn 30 jum) ta' nixfa jew ta' stgħadir bl-ilma. Għal ħamrija maħruta, il-kampjuni għandhom jingabru minn fond ta' 1 sa 20 cm l-isfel. Għall art tal-mergħa (art fil-ħaxix) jew ħamrija oħra meta l-ħrit ma jseħħx, atul perijodi twal (f'mill-anqas staġun wieħed tat-tkabbir), il-fond massimu tal-kampjunar jista jkun kemm xejn aktar minn 20 cm (eż. sa 25 cm). Il-kampjuni tal-ħamrija għandhom ikunu ittrasportati bl-użu ta' kontenituri u skond kondizzjonijiet tat-temperatura li jiggarantixxu li l-propjetajiet inizjali tal-ħamrija ma jkunus sinifikament mibdula.

1.6.3.2. *Ħażna*

L-użu ta' ħamrija miġbura friska mill-għelieqi huwa ippreferut. Jekk ħażna fil-laboratorju ma tistgħax tkun evitata, il-ħamrija tista tkun maħżuna fid-dlam 4 ± 2 °C għal massimu ta' tlett xhur. Matul il-ħażna tal-ħamrija, il-kondizzjonijiet erobiċi għandhom ikunu assigurati. Jekk il-ħamrija tkun miġbura minn żoni ta' fejn din tkun iffriżata għal mill-anqas tlett xhur tas-sena, il-ħażna għal sitt xhur fi – 18 °C tista tkun ikkonsidrata. Il-biomassa mikrobjali tal-ħamrija maħżuna hija mkejla qabel kull esperiment u l-karbonju fil-biomassa għandu jkun mill-anqas 1 % tal-kontenut totali tal-karbonju organiku fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Tqandil u l-preparazzjoni tal-ħamrija għat-test**

1.6.4.1. *Pre-inkubazzjoni*

Jekk il-ħamrija kienet maħżunha (ara s-sezzjoni 1.6.4.2 u 1.7.1.3), pre-inkubazzjoni hija rakkommandata għal perijodu ta' bejn 2 u 28 jum. It-temperatura u l-umidità tal-kontenut tal-ħamrija matul il-pre-inkubazzjoni għandhom ikunu simili għal dik użata fit-test (ara s-sezzjonijiet 1.6.4.2 u 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Karatteristiċi fiżiko-kimiċi*

Il-ħamrija hija manwalment imnaddfa minn oġġeti kbar (eż. ġebel, partijiet ta' pjanti, eċċ.) u imbagħad magħrbla fin-nieda mingħajt tnixxif eċċessiv lejn daqs ta' partiċelli ta' anqas minn jew egwali għal 2 mm. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kampjun tal-ħamrija għandu jkun aġġustat b'ilma distillat jew dejonizzat lejn valur ta' bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma.

1.6.5. **Preparazzjoni tas-sustanza tat-test għall-applikazzjoni mal-ħamrija**

Is-sustanza tat-test hija normalment applikata bl-użu ta' trasportatur. It-trasportatur jista jkun ilma (għal sustanzi li jinħallu fl-ilma) jew solidu inert bħal ma huwa ramel fin tal-kwartz (daqs tal-partiċella: 0,1 - 0,5 mm). Trasportaturi likwidi apparti mill-ilma (eż. solventi organiċi bħal ma huma l-aċetun, il-kloroforma) għandhom ikunu evitati la darba dawn jistgħu joħolqu ħsara għall-mikroflora. Jekk ir-ramel ikunu użat bħala trasportatur, dan jista jkun m iksi bis-sustanza tat-test imdewba jew sospiża f'solvent xieraq. F'tali każi, is-solvent għandu jkun imneħħi bl-evaporazzjoni qabel it-taħlit mal-ħamrija. Għall-aħjar distribuzzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija, relattività ta' 10 g ramel ma kull kilogramma ta' ħamrija (piż xott) huwa rakkommandabbli. Kampjuni tal-kontroll huma ittrattati b'ammont ekwivalenti ta' ilmaa u/jew ramel kwartz biss.

Meta jkunu ittestjati kemikali volatili, it-telf matul it-trattament għandu jkun evitat sa kemm dan ikun possibbli u tentattiv għandu jsir sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja fil-ħamrija (eż. is-sustanza tat-test għandha tkun injettata fil-ħamrija minn diversi postijiet).

1.6.6. **Konċentrazzjonijiet tat-test**

Jekk il-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ jew kimiċi oħrajn b'konċentrazzjonijiet ambjentali prevedibbli huma ittestjati, mill-anqas żewġ konċentrazzjonijiet għandhom ikunu wżati. Il-konċentrazzjoni l-baxxa għandha tirrifletti mill-anqas l-ammont massimu mistenni li jilħaq il-ħamrija waqt kondizzjonijiet prattiċi, fil-waqt li l-konċentrazzjoni l-għolja għandha tkun mutiplu tal-konċentrazzjoni l-baxxa. Il-konċentrazzjonijiet ta' sustanza tat-test miżjuda mal-ħamrija huma ikkalkolati billi tkun preżunta inkorporazzjoni uniformi sa fond ta' 5 cm u l-massa tal-ħamrija f'densità ta' 1.5. Għall-agrokimiċi li huma applikati direttament mal-ħamrija, jew għal kimiċi li dwarhom il-kwantità li tilħaq il-ħamrija tista tkun prevista, il-konċentrazzjonijiet tat-test irrakkommandati huma l-massimu Predicted Environmental Concentration (PEC) (Konċentrazzjoni Ambjentali Mbassra) u ħames darbiet dik il-konċentrazzjoni. Is-sustanzi li huma mistennija li jkunu applikati diversi drabi mal-ħamrija fi staġun wieħed għandhom ikunu ittestjati fil-konċemntrazzjonijiet derivati mill-multiplikazzjoni tal-PEC bin-numru massimu antiċipat ta' l-applikazzjonijiet. L-għoila konċentrazzjoni ittestjata, b'dana kollu, m'għandhiex teċċedi għaxar darbiet il-massimu tar-rata ta' applikazzjoni waħda.

Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, serje ġeometrikuta' mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet għandu jkun użat. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda meħtieġa tal-valuri EC_x.

▼B

1.7. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.7.1. **Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.7.1.1. *It-trattament u l-kontrol*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża fi tlett porzjonijiet ta' piż egwali. Żewġ porzjonijiet huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih il-prodott, u l-ieħor huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-prodott (kontroll). Minimu ta' tlett repliki kemm għall ħamrija ittrattata u wkol mhux ittrattata huma rakkommandati. Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża f'sitt porzjonijiet ta' piż ugwali. Ħmasa mill-kampjunu huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih is-sustanza tat-test, u s-sitt kampjun huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-kimika. Tlett replikati taż-żewġ trattamenti u tal-kontroll huma rakkommandati. Attenzjoni għandha tingħata sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja tas-sustanza tat-test fil-kampjunu tal-ħamrija ittrattata. Matul it-taħlit, l-ikkumpattjar jew gerbubi mgħaqqda għandhom ikunu evitati.

1.7.1.2. *L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija*

L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija tista titwettaq b'żewġ modi: Bħala kampjuni fil-massa ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata jew f'serje ta' subkampjuni individwali u ta' daqs egwali ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata. B'dana kollu, meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali. Meta l-ħamrija tkun inkubata fil-massa, kwantitajiet kbar ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata huma ippreparati u s-sub-kampjuni għall-analiżi huma miġbura kif meħtieġ matul it-test. L-ammont inizjalment ippreparat għal kull trattament u kontroll jiddependi mid-daqs tas-sub-kampjuni, in-numru ta' repliki użati għall-analiżi u n-numru massimu antiċipat tal-ħinijiet tal-kampjunar. Il-ħamrija inkubata fil-massa għamndha tkun imħallta sewwa qabel is-sub-kampjuni. Meta l-ħamrija hija inkubata f'serje individwali ta' ħamrija, kull ħamrija ittrattata jew mhux trattata fil-massa hija diviża fin-numru meħtieġ ta' sub-kampjuni, u dawn huma utilizzati kif meħtieġ. Fl-esperimenti meta tnejn jew aktar drabi tal-kampjunar jistgħu ikunu antiċipati, sub-kampjuni biż-żejjed għandhom ikunu ippreparati sabiex iqisu ir-replikati kollha u l-waqtiet kollha tal-kampjunar. Mill-anqas tlett kampjuni tar-replikati tal-ħamrija tat-test għandhom ikunu inkubati permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi (ara s-sezzjoni 1.7.1.1). Matul it-testijiet kollha, kontenituri xierqa, bi spazju fil-wiċċ suffiċjenti, għandhom ikunu użati sabiex ikunu evitati l-kondizzjonijiet anerobiċi. Meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali.

1.7.1.3. *Il-kondizzjonijiet u t-tul tat-testijiet*

It-test huwa mwettaq fid-dlam f'temepratura tal-kamra ta' 20 ± 2 °C. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kamjuni tal-ħamrija għandu jkun miżmum matul it-test għal bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.4.2) b'medda ta' ± 5 %. Ilma distillat jew deonizzat jista jkun miżjud kif meħtieġ.

It-tul minimu tat-testijiet huwa 28 jum. Jekk agrokimiċi huma ittestjati, il-kantitajiet tad-diossidu tal-karbonju rilaxxat jew ta' lk-ossiġenu ikkunsmat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma paragunati. Jekk dawn ikunu differenti b'aktar minn 25 % fil-jum 28, it-test jitkompla sakemm differenza egwali għal, jew anqas minn 25 % tkun akkwistata, jew għal massimu ta' 100 jum, liema minnhom ikun l-aqsar. Għal dawk li ma humiex agrokimiċi, it-test ikun terminat wara 28 jum. Fil-jum 28, il-kwantitajiet tan-nitrat fil-kampjuni tal-ħamrija ittrattata jew tal-kontroll huma determinati u l-valuri EC_x ikunu ikkalkolati.

▼B

1.7.2. **Kampġjunaar u analiżi tal-ħamrija**

1.7.2.1. *Kampjunar skedat tal-ħamrija*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-kampjuni tal-ħamrija huma analiżżati għan-nitrat fil-jiem 0, 7, 14 u 28. jekk test imtawwal ikun meħtieġ, aktar kejl għandu jseħħ f'intervalli ta' 14-il jum, wara l-jum 28.

Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test huma wżati u l-kampjuni tal-ħamrija huma analiżżati għan-nitrat fil-bidu (jum 0) u fit-tmiem tal-perijodu ta' l-espożizzjoni (28 jum). Kejl intermedju, eż. fil-jum 7, jista jkun miżjud jekk dan ikun meqjus bħala meħtieġ. L-informazzjoni akkwistata fil-jum 28 hija użata għad-determinazzjoni tal-valux ECx dwar il-kimika. Jekk mixtieq, l-informazzjoni mill-jum 0 tal-kampjuni tal-kontroll jistgħu ikunu wżati sabiex jirraportaw il-kwanititá inizjali tan-nitrat fil-ħamrija (12).

1.7.2.2. *Kejl tar-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju*

L-ammont ta' nitrat iffurmat f'kull replika trattata jew tal-kontroll huwa determinat f'kull waqt tal-kampjunar. Il-kampjuni tal-ħamrija huma mħallta ma ammint suffiċjenti ta' glukożju sabiex iħeġġeġ reazzjoni immedjata ta' respirazzjoni massima. L-ammont ta' glukożju meħtieġ sabiex iħeġġeġ ir-reazzjoni respiratorja massima minn ħamrija partikolari jista jkun determinat b'test preliminarju li jutilizza serje ta' konċentrazzjonijiet ta' glukożju (14). B'dana kollu, għal ħamrija mrammla bi 0,5-1,5 % karbonju organiku, 2 000 mg sa 2 000 mg glukożju kull kg piż tal-ħamrija xotta huwa normalment suffiċjenti. Il-glukożju jistgħa jkun miħun fi trab mar-ramel kwarz nadif (10 gramel/kd piż tal-ħamrija xotta) u imħallta b'mod omoġeniku mal-ħamrija.

Il-kampjuni tal-ħamrija emendata bil-glukożju hija inkubata f'apparat xieraq għall-kejl tar-rati tar-respirazzjoni, jew kontinwament, kull siegħa, jew kull sagħtejn (ara s-sezzjoni 1.6.1) fi 20 ± 2 °C. Id-diossidu tal-karbonju rilaxxat jew l-ossiġenu ikkunsmat huwa mkejjel għal 12-il siegħa konsekuttivi u l-kejl għandu jibda malajr kemm jista jkun possibbli, i.w. fi żmien 1 sa 2 siegħat wara s-supplement tal-glukożju. Il-kwantitajiet totali tad-diossidu tal-karbonju rilaxxata jew l-ossiġenu ikkunsmat matul it-12-il siegħa huma mkejla u r-rati medja tar-respirazzjoni huma determinati.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'agrokimiċi, il-kwalità tad-diossidu tal-karbonju rilaxxat minn, jew l-ossiġenu ikkunsmat f'kull replika tal-kampjun tal-ħamrija għandha tkun irreġistrata, u l-valuri medji tar-replikati kollha għandhom ikunu ipprovduti f'għamla tabulari. Ir-riżultati għandhom ikunu evalwatu b'metodi statistiċi xierqa u ġeneralment aċċettabbli (eż. Test-F, 5 % livell sinifikanti). Ir-rati tar-respirazzjoni indotti bil-glukożju huma espressi fi mg diossidu tal-karbonju/kd piż tal-ħamrija xotta/siegħa jew mg ossiġenu/piż tal-ħamrija xotta/siegħa. Il-medja tar-rata tal-formazzjoni tad-diossidu tal-karbonju jew il-medja tar-rata tal-konsum ta' l-ossiġenu f'kull trattament huma mqabbla ma dawk tal-kontroll, u d-devjazzjoni perċentwali mill-kontroll hija ikkalakolata.

▼B

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'dawk li ma humiex agrokimiċi, il-kantità ta' nitrat iffurmat f'kull replika huwa determinat, u l-kurva doża-reazzjoni hija ippreparata għall-estimi tal-valuri EC_x Ir-rati tar-respirazzjoni indotta bil-glukożju (i.e. mg diossidu tal-karbonju/kg piż tal-ħamrija xotta.siegħa jew mg ossiġenu/piż tal-ħamrija xotta.siegħa) misjuba fil-kampjuni ittrattati wara 28 jum huma mqabbla ma dawk misjuba fil-kontroll. Minn din l-informazzjoni, il- % tal-valuri ta' l-inibizzjoni għal kull konċentrazzjoni tat-test huma ikkalkolati. Dawn il-persentaġġi huma mpinġija kontra l-konċentrazzjoni, u l-proċeduri statistiċi huma mbagħad użati għall-kalkolu tal-valuri EC_x. Limiti ta' l-affidabbilità (p = 0,95) għal EC_x ikkalkolati huma wkoll determinati bl-użu tal-proċeduri normali (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Meta r-riżultati mit-testijiet bl-agrokimiċi huma evalwati, u d-differenza fir-rati tal-formazzjoni tar-respirazzjoni bejn it-trattament baxx (i.e. il-massimu tal-konċentrazzjoni prevista) u l-kontroll tkun egwali għal, jew anqas minn 25 % fi kwalunkwe kampjun fil-waqt wara l-jum 28, il-prodott jista jkun evalwat bħala li jkollu infuwenza f'terminu fit-tul fuq it-trasformazzjoni tal-karbonju fil-ħamrija. Meta r-riżultati minn testijiet b'kimiċi apparti milli l-agrokimiċi huma evalwati, il-Valuri EC_{50}, EC_{25} u/jew EC_{10} huma wżati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

RAPPORTTAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Identifikazzjoni sħiħa tal-ħamrija użata, inkluż:

— referenza ġeografika tas-sit (latitudini, longitudini);

— informazzjoni dwar l-istorja tas-sit (i.e. il-koperta veġittiva, it-trattamenti bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ, trattamenti bil-fertilizzanti, kontaminazzjoni aċċidentali, eċċ.);

— is-sekwenza ta' l-użu (eż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.);

— il-fond tal-kampjunar (cm);

— il-kontenut ramel/ħama'/tafal (% tal-piż);

— pH (fl-ilma);

— kontenut karbonju organiku (% piż xott);

— kontenut tan-nitroġenu organiku (% piż xott);

— kapaċità ta' l-iskambju tal-jonju (mmol/kg);

— biomassa mikrobjali f'termini ta' persentaġġ tal-karbonju organiku totali;

— referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru;

— l-informazzjoni li tirrigwardja il-ġbir u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija;

— dettalji tal-pri-inkubazzjoni tal-ħamrija, jekk ikun hemm.

▼B

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;

— l-informazzjoni ta' l-identifikazzjoni kimika, meta relevanti, inkluża l-formula strutturali, il-purità (i.e. għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ il-persentaġġ ta' l- ingredjent attiv), il-kontenut tan-nitroġenu.

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji ta' l-emenda tal-ħamrija b'substrata organika;

— in-numru tal-konċentrazzjonijiet fil-kimika tat-test użata u, meta xieraq, ġustifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet magħżula;

— dettalji ta' l-applikazzjoni tas-substrata tat-test fil-ħamrija;

— temperatura ta' l-inkubazzjoni;

— il-kontenut ta' l-umidità fil-bidu u matul it-test;

— il-metodu użat ta' l-inkubazzjoni tal-ħamrija (i.e. bħala massa jew bħala serje ta' subkampjuni individwali);

— in-numru ta' replikati;

— id-drabi tal-kampjunar.

Riżultati:

— metodu u apparat użat għall-kejl tar-rati tar-respirazzjoni;

— dettalji tabulate, inklużi l-valuri individwali u medji għall-kwantitajiet tad- diossidu tal-karbonju jew ta' l-ossiġenu;

— il-varjazzjoni bejn ir-replikati fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll;

— spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet imwettqa fil-kalkoli, jekk relevanti;

— il-varjazzjoni perċentwali fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull waqt tal-kampjunar, jekk xieraq, il-limitu ta' l-affidibbilità tal-valur EC_5 b'95 fil-mija affidibbilità, EC_x oħrajn (i.e. EC_{25} jew EC_{10}) b'intervalli ta' l-affidibbilità, u grafika tal-kurva doża-reazzjoni;

— trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq;

— l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jkunu ta' għajnuna fl- interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in "Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in "Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. **TRASFORMAZZJONIEROBIKA UANEROBIKA FIL-ĦAMRIJA**

1. **METODU**

Dan il-Metodu tat-Test huwa replika għal OECD TG 307 (2002)

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-Metodu tat-test huwa ibbażat fuq linji ta' gwida eżistenti (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Dan il-metodu deskritt f'dan il-metodu tat-test huwa iddisinjat għall-evalwazzjoni tat-trasformazzjoni erobika u anerobika tal-kimiċi fil-ħamrija. L-esperimenti huma mwettqa sabiex ikun determinat (i) ir-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test, u (ii) in-natura u r-rata tal-formazzjoni u t-tnaqqis tat-traformazzjoni tal-prodotti li dwarhom il-pjanti u l-organiżmi fil-ħamrija jistgħu ikunu esposti. Tali studji huma meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati fil-ħamrija jew li huma pjuttost li jilħqu l-ambjent tal-ħamrija. Ir-riżultati ta' tali studji fil-laboratorju jistgħu wkoll ikunu wżati sabiex jiżviluppaw il-protokolli tal-kampjunar u ta' l-analiżi fl-oqsma ta' studju relatati.

L-istudji erobiċi u anerobiċi ma tip wieħed ta' ħamrija huma ġeneralment suffiċjenti għall-evalwazzjoni tal-passaġġi tat-trasformazzjoni (8) (10) (11). Ir-rati tat-trasformazzjoni għandhom ikunu determinati f'mill-anqas tlett ħamrija addizzjonali (8) (10).

Laqgħa ta' Ħidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Ħamrija/Sediment li nżammet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (10) qablet dwar in-numru u t-tip ta' ħamrija għall-użu f'dan it-test. It-tipi tal-ħamrija ittestjati għandhom ikunu rappreżentattivi tal-kondizzjonijiet ambjentali ta' fejn l-użu jew ir-rilaxx ikun sjjer iseħħ. Per eżempju, il-kimiċili jistgħu ikunu rilaxxati fi klimi subtropikali sa tropikali għandhom ikunu ittestjati bil-Ferrasoli jew in-Nitrasoli (sistema FAO). Il-Laqgħa ta' Ħidma kienet ukoll għamlet rakkommandazzjonijiet li jirrigawrjaw il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija, ibbażari fuq il-Linja ta' Gwida ISO (15). L-użu tal-ħamrija mistgħadra (tar-ross) hija wkoll ikkunsidrata f'dan il-metodu.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sustanza tat-test: Kwalunkwe sustanza, sew jekk kompost oriġinali jew il-prodotti relevanti tat-trasformazzjoni.

Prodotti tat-trasformazzjoni: Is-sustanzi kollha li jirriżultaw mir-reazzjonijiet tat-trasformazzjoni biotiċi jew abiotiċi tas-sustanza tat-test, inklużi il-CO2 u l-prodotti li huma marbuta mar-residwi.

“Residwi marbuta”: “Residwi marbuta” tirrapreżemnta komposti fil-ħamrija, pjanti jew annimali, li jippersistu fil-matriċi fil-għamla ta' sustanza oriġinali jew tal-prodotti metaboliti/trasformazzjoni wara l-estrazzjoni. Il-metodu ta' l-estrazzjoni m'għandux sostanzjalment jibdel il-komposti nfushom jew l-istruttura tal-matriċi. In-natura tar-rabta tista tkun kjarifikata parzjalment bil-metodi ta' l-estrazzjoni tat-tibdil-tal-matriċi u b'tekniċi analitiċi sofistikati. Sal-lum, per eżempju, ir-rabtiet kovalenti joniċi u sorptivi, kif ukoll l-ingassar, kienu ġew identifikati b'dan il-mod. Ġeneralment, il-formazzjoni tar-residwi marbuta tnaqqas il-bioaċċessibbiltà u l-biodisponabbiltà sinifikament (12) (Modifikati minn IUPAC 1984 (13)).

Trasformazzjoni erobika: Reazzjonijiet li jseħħu fil-preżenza ta' l-ossiġenu molekulari (14).

▼B

Trasformazzjoni anerobika: Reazzjonijiet li jseħħu fl-esklużjoni ta' l-ossiġenu molekulari (14).

Ħamrija: Hija taħlita ta' kostitwenti kimiċi minerali u organiċi, dawn ta' l-aħħar ikun fihom komposti ta' kontenut għoli tal-karbonju u n-nitroġenu u ta' piżijiet molekulari għoljin, animali b'organiżmi żgħat (l-aktar mikro-). Il-ħamrija tista tkun imqandla f'żewġ stati:

(a) mhux disturbata, kif tkun żviluppat matul iż-żmien, f'saffi karatteristiċi tat-tipi tal-varjetà tal-ħamrija;

(b) disturbata, kif normalment tinsab f'għelieqi ħarratija jew kif isseħħ meta l-kampjuni huma miġbura bit-tħaffir u kif użata f'dan il-metodu ta' test (14).

Mineralizzazzjoni: Hija d-degradazzjoni kompleta ta' kompost organiku lejn CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, u CH_4, CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet anerobiċi. Fil-kuntest ta' dan il-metodu taa' test, meta kompost bit-tikketta-^{14}C ikun użat, il-mineralizzazzjoni tfisser dehradazzjoni estensiva li matulha atomu tal-karbonu ttikkettjat ikun ossidizzat bil-rilaxx ta' l-ammont xieraq ta' $^{14}CO_2$ (14).

Nofs-ħajja: $t_{0,5}$, huwa l-ħin meħtieġ għal 50 % trasformazzjoni tas-sustanza tat-test meta t-trasformazzjoni tista tkun deskritta bil-kinetiċi ta' l-ewwel ordni; din hija independenti mill-konċentrazzjoni.

DT_{50} (Għibien Ħin 50): Huwa l-ħin li fih il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 50 %; din hija differenti min-nofs-ħajja t0,5 meta t-trasformazzjoni ma tkunx issegwi il-kinetiċi ta' l-ewwel ordni.

DT_{75} (Għibien Ħin 75): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 75 %.

DT_{90} (Għibien Ħin 90): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 90 %.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu wżati għall-karetterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti bil-metodi spektroskopiċi u kromatografiċi.

1.4. L-APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

Il-metodu huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi kollha (mhux ittikkettjati jew radjotikkettjati) li dwarhom metodu analitiku b'eżattezza u sensittività suffiċjenti huma disponibbli. Dan huwa applikabbli għal komposti kemm xejn volatili, mhux volatili, li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. It-test m'għandux ikun applikat lejn kimiċi li huma ferm volatili minn ġewwa l-ħamrija (eż., fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistgħux jinżammu fil-ħamrija skond il-kondizzjonijiet sperimentali ta' dan it-test.

▼B

1.5. INFORMAZZJONI DWARIS-SUSTANZATAT-TEST

Sustanza tat-test mhux-ittikkettjata jew ittikkettjata tista tkun użata sabiex tkejjel ir-rata tat-trasformazzjoni. Il-materjal tikkettjat huwa meħtieġ għall-istudju tal-passaġġ tat-trasformazzjoni u sabiex ikun stabbilit il-bilanċ tal-massa. Tikkettjar-14C huwa rakkommandat imma l-użu ta' iżotopi oħrajn bħal ma huma ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, jistgħu wkoll ikunu utili. Sa kemm huwa possibbli, it-tikketta għandha tkun imqiegħda fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekolu ([1]) (10). Il-Purità tas-sustanza tat-test għandha tkun mill-anqas 95 %.

Qabel ma jitwettaq test dwar it-trasformazzjoni eronika u amerobika fil-ħamrija, l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test għandha tkun disponibbli.

(a) solubilità fl-ilma (il-Metodu A.6);

(b) solubilità f'solventi organiċi;

(ċ) pressjoni tal-fwar (il-Metodu A.4) u l-liġi kostanti Henry;

(d) il-koeffiċjent tal-qsim n–oktano/ilma (il-Metodu A.8);

(e) stabbilità kimika fid-dlam (idrolisi) (il-Metodu C.7);

(f) pKa jekk il-molekolu jkun probabbli għal protonazzjoni jew deportonazzjoni (OECD Linja ta' Gwida 112) (16).

Informazzjhoni utili oħra tista tinkludi dettalji dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test fuq il-mikro-organiżmi tal-ħamrija (il-Metodi tat-Testijiet C.21 u C.22) (16).

Il-metodi analitiċi (inklużi l-metodi ta' l-estrazzjoni u tat-tindif) għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tat-trafor-mazzjoni tal-prodotti tagħha, għandhom ikunu disponibbli.

1.6. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-kampjuni tal-ħamrija huma ittrattati bis-sustanza tat-test u inkubati fid-dlam f'garafini tat-tip biometriċi jew f'sistemi ta' nixxija kontinwa skond il-kondizzjonijiet kontrollati tal-laboratorju (f'temepratura u l-umidità tal-ħamrija kostanti). Wara intervalli ta' ħin xieraq, il-kampjuni tal-ħamrija huma estratti u analizzati mis-sustanza oriġi-nali u għall-prodotti tat-trasformazzjoni. Prodotti volatili huma wkoll, miġbura għall-analiżi bl-użu ta' apparati xierqa ta' l-assorbazzjoni. Bl-użu tal-materjal ittikkettjat-^{14}C, ir-rati varji tal-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test jistgħu ikunu mkejla bin-nassa evoluta $^{14}CO_2$ u l-bilanċ tal-massa, inkluża l-formazzjoni ta' residwi marbuta mal-ħamrija, jisgħu ikunu stabbiliti.

1.7. KRITERJI TAL-KWALITÀ

1.7.1. **Irkupru**

L-estrazzjoni u l-analiżi ta', mill-anqas, nofs il-kampjunu duplikati tal-ħamrija, wara ż-żieda tas-sustanza tat-test, tagħti l-ewwel indikaz-zjoni tar-repetabbiltà tal-metodu nalitiku u ta' l-uniformità tal-proċe-dura ta' l-applikazzjoni għas-sustanza tat-test. L-irkupri fi stadji aktar tard ta' l-esperimenti huma mogħtija bil-bilanċi rispettivi tal-massa. L-irkupri għandhom ikunu fil-medda ta' minn 90 % sa 110 % tal-kimiċi ittikkettjati (8) u minn 70 % sa 110 % għal kimiċi mhux ittikkettjati (3).

([1]) Per eżempju, jekk is-sustanza għat-test ikun fiha ċirku wieħed. L-ittikkettjar fuq dan iċ-ċriku huwa meħtieġ. Jekk is-sustanza għat-test ikun fiha żewġ ċrieki jew iktar, studji separati jistgħu jkunu meħtieġa biex tiġi evalwata x-xorti ta' kull ċirku ttikkettjat u biex tinkiseb informazzjoni adattata dwar il-formazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni.

▼B

1.7.2. **Ir-repettabbiltà u s-sensittività tal-metodu analitiku**

Ir-repetabbilità tal-metodu analitiku (eskluża l-preċiżjenza ta' l-estrazzjoni inizjali) sabiex tkun kwantifikata s-sustanza tat-test u tat-trasformazzjoni tal-prodotti tista tkun verifikata b'analiżi duplikata ta' l-istess estratt tal-ħamrija, inkubat għal tul ta' żmien biżżejjed għall-formazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti.

Il-limitu ta' sejbien (limit of detection (LOD)) tal-metodu analitiku għas-sustanza tat-test u għat-trasformazzjoni tal-prodotti għandu jkun mill-anqas 0,01 mg.kg-1 ħamrija (bħala sustanza tat-test) jew 1& tad-doża applikata, liema minnhom hija l-anqas. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni (limit of quantification (LOQ)) għandu wkoll ikun speċifikat.

1.7.3. **L-eżatezza tad-dettalji tat-trasformazzjoni**

Analiżi regressiva tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-ħin, tagħti informazzjoni xierqa dwar l-affiddabbilità tal-kurva tat-trasformazzjoni u tippermetti il-kolkolu tal-limiti affidabbli ta' nofs-ħajjiet (fil-każ ta' psewdo kinetiċi ta' l-ewwel ordni) jew il-valuri DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90}.

1.8. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.8.1. **Apparat u reaġenti kimiċi**

Is-sistemi ta' l-inkubazzjoni jikkonsistu minn sistemi statiċi magħluqa jew sistemi xierqa ta' nixxija kontinwa (7)(17). Eżempji ta' l-apparat xieraq ta' nixxija kontinwa fil-ħamrija u l-garafina tat-tip-biometriku huma murija fil-Fihuri 1 u 2, rispettivament. Iż-żewġ tipi tas-sistemi ta' l-inkubazzjoni għandhom vantaġġi u limitazzjonijiet (7)(17).

Apparat normali tal-laboratorju huwa meħtieġ, u speċjalment dan li ġej:

— Strumenti analitiċi bħal ma huma l-apparat GLC, HPLC, TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' sejbien għall-analiżi ta' sustanzi radjo-tikketta jew mhux-tikketta jew metodu tat-trattib ta' l-iżotopi inversi;

— Strumenti għall-iskopijiet ta' l-identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);

— Strument ta' l-għadd tal-likwidu xintillanti;

— Ossidizzatur għall-kombustjoni tal-materjal radjo-attiv;

— Ċentrifuga;

— Apparat ta' l-estrazzjoni (per eżempju, tubi taċ-ċentrifuga għal estrazzjoni fil-kiesaħ u apparat Soxhlet għal estrazzjoni kontinwa taħt ir-refluss);

— Strumentazzjoni għall-konċentrazzjoni tat-taħlitiet u l-estratti (eż. evaporator rotanti);

— Banju ta' l-ilma;

— Apparat mekkaniku tat-taħlit (eż. maagna li tagħġen, ħallati rotanti).

▼B

Ir-reaġenti kimiċi użati jinklusu, per eżempju:

— NaOH, grad analitiku, 2 mol. dm^{-3}, jew bażi oġra xierqa (eż. KOH, ethanolamine);

— H_2SO_4, grad analitiku, 0,05 mol. dm^{-3};

— Ethylene glycol, grad analitiku;

— aterjali solidi ta' l-assorbazzjoni bħal ma huma l-ġir tas-soder u l-buqi tal-polyurethane;

— Solventi organiċi, grad analitiku, bħal ma hu l-aċetun, il-metanol, eċċ.;

— Likwidu tax-xintillazzjoni.

1.8.2. **L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test**

Għal żieda ma, u d-distribuzzjoni fil-ħamrija, is-sustanza tat-test tista tkun imdewwba fl-ilma (deonizzat jew distillat) jew, meta meħtieġ, f'ammonti minimi ta' aċetun jew solventi organiċi oħrajn (6) li fihom is-sustanza tat-test tkun tinħall u stabbli b'mod suffiċjenti. B'dana kollu, l-ammont ta' solvent magħżul m'għandux ikollu influwenza sinifikanti fuq l-attività mikrobjali tal-ħamrija (ara s-sezzjonijiet 1.5 u 1.9.2-1.9.3) L-użu ta' solventi li jfixklu l-attività mikrobjali, bħal ma huma l-kloroform, id-diklorometanju u solventi ħaloġenizzati oħrajn, għandu jkun evitat.

Is-sustanza tat-test tista wkoll tkun miżjuda bħala solidu, eż. mħallta mar-ramel kwatrz (6) jek f'test żgħir ta' sub-kampjun tal-ħamrija li tkun ġiet imnixxfa fl-arja u sterilizzata. Jekk is-sustanza tat-test hija miżjuda bl-użu ta' solvent, is-solvent għandu jkun imġolli li jevapora qabel ma s-sub-kampjun hekk miżjud ikun imħallat mal-kampjun oriġinali mhux-sterili tal-ħamrija.

Għal kimiċi ġenerali, li r-rotta maġġura tad-dħul tagħhom fil-ħamrija hija matul l-applikazzjoni tal-ħama' tad-drenaġġ/mill-ħmieġ ta' l-annimali, is-sustanza tat-test għandha l-ewwel tkun miżjuda mal-ħama' li imbagħad tkun miżjuda mal-kampjun tal-ħamrija. (ara s-sezzjonijiet 1.9.2 u 1.9.3)

L-użu ta' prodotti formulati mhux, bħala rutina, rakkommandat. B'dana kollu, eż. għal sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu, l-użu ta' materjal; formulat jista jkun alternattiva xierqa.

1.8.3. **Il-ħamrija**

1.8.3.1. *L-għażla tal-ħamrija*

Għad-determinazzjoni tal-passaġġ tat-trasformazzjoni, ħamrija rapreżentattiva tista tkun użata' ħamrija grassa mrammla jew ħamrija grassa bil-ħama' jew ħamrija grassa jew ramel grass (skond il-klassifikazzjoni FAO u USDA 18) bi pH ta' 5,5-8,0, kontenut karboniku organiku ta' 0,5-2,5 % u biomassa mikrobjali ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali hija rakkommandata (10).

Għall-istudji tar-rata tat-trasformazzjoni mill-anqas tlett żidiet tal-ħamrija għandhom ikunu wżati li jirrapreżentaw medda ta' ħamrija relevanti. Il-ħamrija għandha tvarja fil-kontenut karboniku organiku, pH, kontenut tat-tafal u l-biomassa mikrobjali (10).

▼B

Il-ħamrija kollha għandha tkun karatterizzata, mill-anqas, għal tiswir (% ramel, % ħama', % tafal) (skond il-klassifikazzjoni FAO u ESDA (18)), pH, kapaċità ta' skambju tal-jonji, karbonju organiku, densità tal-massa, karatteristiċi taż-żamma ta' l-ilma [2] ([1]) u l-bijomassa mikrobjali (biss għal studju erobiċi). Informazzjoni addizzjonali dwar il-propjetajiet tal-ħamrija jistgħu ikunu utili fl-interpretazzjoni tar-riżultati. Għad-determinazzjoni tal-karatteristiċi tal-ħamrija, il-metodi rakkommandati fir-referenzi (19) (20) (21) (22) (23) jistgħu ikunu wżati. Il-bijomassa mikrobjali għandha tkun determinata bl-użu tar-respirazzjoni indotta-fis-sub-strata (substrate-induced respiration (SIR)) il-metodu (25) (26) jew metodi alternattivi (20).

1.8.3.2. *Ġbir, tqandil, u l-ħażna tal-ħamrija*

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-għalqa minn fejn il-ħamrija tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġetali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, żidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Jekk il-ħamrija tkun ġiet ittrattata bis-sustanza tat-test jew bl-analogi strutturali tagħha matul l-erba' snin preċedenti, dawn m'għandhomx ikunu użati għall-istudji tat-transformazzjoni (10) (15).

Il-ħamrija għandha tkun miġbura friska mill-għalqa (mill-orizzont A jew mis-saff tal-wiċċ f'20 cm) b'kontenut ta' l-ilma fil-ħamrija li jiffaċilita l-għarbiel. Għal ħamrija oħra apparti milli dik mistgħadra, il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (> 30 jum) ta' nixfa, ġlata jew mifqugħa bl-ilma (14). Il-kampjuni għandhom ikunu trasportati b'manjera li tnaqqas it-tibdiliet fil-kontenut ta' l-ilma fil-ħamrija u għandhom jinżammi fid-dlam b'aċċess liberu ta' arja, kemm jista jkun possibbli. Borża tal-plastik, kemm xejn marbuta, hija ġeneralment adekwata għal dan l-iskop.

Il-ħamrija għandha tkun proċessata malajr kemm jista jkun possibbli wara l-kampjunar. Veġitazzjoni, fawna kbira tal-ħamrija u ġebel għandhom ikunu mneħħija qabel ma l-ħamrija tkun mogħddija minn għarbiel ta' 2 mm li jneħħli ġebel żgħar, fawna u l-frak tal-pjanti. Tnixxif estensiv u t-tisħiq tal-ħamrija, qabel l-għarbiel, għandhom ikunu evitati (15).

Meta il-kampjunar fil-għalqa jkun diffiċli fix-xitwa (il-ħamrija iffriżta jew koperta f'saffi ta' borra), din għandha tingħabar mil-ħamrija tal-lott maħżuna f'serra b'koperta ta' pjanti (eż. ħaxix jew taħlita ta' ħaxix u silla) L-istudji bil-ħamrija miġbura friska mill-għalqa huma ferm prefereuti, imma jekk il-ħamrija miġbura u ipproċessata ikunu tiġi maħżuna qabel il-bidu ta' l-istudju, il-kondizzjonijiet tal-ħażna għandhom ikunu adekwati u biss għal-limitu ta' żmien (4 ± 2 °C għal massimu ta' tlett xhur) sabiex jinżamm l-attività mikrobjali ([2]) 1. Struzzjonijiet dettaljati dwar il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-ħamrija, li għandha tkun użata fl-esperimenti tal-biotrasformazzjoni, jistgħu jinstabu fi (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) Il-karatteristika tar-ritenzjoni ta' l-ilma fil-ħamrija tista' titkejjel bħala *field capacity*, bħala kapaċità taż-żamma ta' l-ilma jew bħala *water suction tension (pF)*. Għall-ispjegazzjoni ara Anness 1. Għandu jiġi r-rappurtat fir-rapport ta-test jekk il-karatteristiċi tar-ritenzjoni ta' l-ilma u d-densità goffa tal-ħamrija ġew determinati fil-kampjuni ta' l-għelieqi *not disturbed* jew f'kampjuni *disturbed* (proċessati).

([2]) Recent research results indicate that soils from temperate zones can also be stored at –20 °C for more than three months (28)(29) without significant losses of microbial activity.

▼B

Qabel ma l-ħamrija ipproċċessata tkun użata f'dan it-test, din għandha tkun l-ewwel inkubata sabiex tippermetti l-ġerminazzjoni u t-tneħħija taż-żrieragħ, u sabiex ikun stabbilit mill-ġdid l-ekwilibriju tal-metaboliżmu mikrobjali bħala segwiment tal-kambju mill-kampjunar jew mill-kondizzjonijiet tal-ħażna lejn il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni. Perijodu ta' qabel l-inkubazzjoni ta' bejn 2 u 28 jum, li jqarreb it-temperatura u l-kondizzjonijiet ta' l-umidità tat-test attwali huma ġeneralment adekwati (15).Iż-żmien tal-ħażna u ta' qabel l-inkubazzjoni, flimkien, m'għandhomx jeċċedu t-tlett xhur.

1.9. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.9.1. **Kondizzjonijiet tat-test**

1.9.1.1. *Temperatura tat-test*

Matul il-perijodu kollu tat-test, il-ħamrija għandha tkun inkubata fid-dlam f'temperatura kostanti li tirrapreżenta l-kondizzjonijiet klimatiċi ta' fejn l-użu jew ir-rilaxx ikun sejjer iseħħ. Temperatura ta' 20 ± 2 °C hija rakkommandata għas-sustanzi kollha tat-test li jistgħu jilħqu t-temperatura klimatika tal-ħamrija. It-temperatura għandha tkun sorveljata.

Dwar il-kimiċi applikati jew rilaxxati fi klimi kesħin (eż. pajjiżi tat-tramunta, matul il-perijodi tal-ħarifa/xitwa), kampjuni addizzjonali tal-ħamrija għandhom ikunu inkubati imma f'temperatura aktar baxxa (eż. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Il-kontenut ta' l-umidità*

Għat-testijiet tat-trasformazzjoni permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, il-kontenut ta' l-umidità tal-ħamrija ([1]) 2għandu jkun aġġustat lejn u miżmum fi pF bejn 2,0 u 2,5 (3). Il- kontenut ta' l-umidità fil-ħamrija huwa espress bħala massa ta' l-ilma għal kull massa ta' ħamrija xotta u għandu jkun ikkontrollat regolarment (eż. f'intevalli ta' ġimgħatejn) bl-użin fil-garafini ta' l-inkubazzjoni u t-talf ta' l-ilma kumpensdat biż-żieda ta' l-ilma (preferibbilment ilma tal-vit sterilizzat mill-filtru). Attenzjoni għandha tingħata sabiex ikunu prevenuti jew minimizzati t-telf tas-sustanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni bil-volatilizzazzjoni u/jew il-fotodegradazzjoni (jekk ikun hemm) matul iż-żieda ta' l-umidità.

Għat-testijiet tat-trasformazzjoni fil-kondizzjonijiet anerobiċi u mistgħadra, il-ħamrija tkun saturata bl-ilma mfawwar.

1.9.1.3. *Kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni erobika*

Fis-sistimi tan-nixxija kontinwa, il-kondizzjonijiet erobiċi ikunu miżmuma bit-tlaħliħ intermittenti jew bil-ventilazzjoni kontinwa b'arja umidifikata. Fil-garafini biometriċi, skambju ta' l-arja jkun miżmum b'diffużjoni.

1.9.1.4. *Kondizzjonijiet erobiċi sterili*

Sabiex tkun akkwistat l-informazzjoni dwar ir-releavanza tat-trasformazzjon abjotika tas-sustanza tat-test, kampjunu tal-ħamrija jistgħu ikunu sterilizzati (għall-metodi ta' l-isterilizzazzjoni ara r-referenzi 16 u 29), ittrattati bis-sustanza sterili tat-test (eż. żieda ta' taħlita matul filtru sterili) u mogħtija l-arja bl-użu ta' arja sterili umidifikata kif deskritt fis-sezzjoni 1.9.1.3, Għal ħamrija mistgħadra, ħamrija u ilma għandhom ikunu sterilizzati u l-inkubazzjoni għandha tkun imwettqa kif deskritt fis-sezzjoni 1.9.1.6.

([1]) Il-ħamrija la għandha tkun imxarrba wisq u lanqas niexfa wisq sabiex tinżamm l-*aeration* adegwata u n-nutrizzjoni tal-ħamrija *microflora*. Kontenuti ta' umdità rakkomandati għall-medda tat-tkabbir mikrobbjali ottimali minn 40-60 % il-kapaċità taż-żamma ta' l-ilma (WHC) u minn 0,1-0,33 bar (6). Il-medda ta' l-aħħar hija ekwivalenti għall-medda pF-ta' 2,0 – 2,5. Il-kontenuti ta' umdità tipiċi ta' tipi varji ta' ħamrija huma mogħtija f'Anness 2.

▼B

1.9.1.5. *Kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni anerobika*

Sabiex ikunu stabbiliti l-kondizzjonijiet amerobiċi, il-ħamrija ittrattata mis-sustanza tat-test u unkubata fil-kondizzjonijiet erobiċi għal 30 jum jew għal "nofs-ħajja" waħda jew DT_{50} (liema minnhom ikun l-iqsar) hija mbagħad mistgħadra fl-ilma (saff ta' 1-3 cm ilma) u s-sistema ta' l-inkubazzjoni mlaħilħa b'gass inert (eż. nitroġenu jew argonu) ([1]) 3. Is-sistema tat-test għandha tippermetti l-kejl bħal ma huma pH, konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu u l-potenzal redox u tinkludi l-apparati tan-nassa għal prodotti volatili. Sistema tat-tip biometrika għandha tkun magħluqha sabiex tevita id-dħul ta' l-arja bid-diffużjoni.

1.9.1.6. *Kondizzjonijiet ta' l-ikubazzjoni fil-mistgħadar*

Sabiex tkun studjata t-trasformazzjoni tal-ħamrija fl-għelieqi mistgħadra tar-ross, il-ħamrija tkun mifquha fl-ilma b'saff ta' madwar 1-5 cm u s-sustanza tat-test tkun applikata mal-fażi ta' l-ilma (9). Ħamrija b'fond ta' mill-anqas 5 cm hija rakkomandabbli. Is-sistema hija ventilata bl-arja permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, il-pH, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu u l-potenzal tar-redox fis-saff akweju għandhom ikunu sorveljati u irraportati. Perijodu ta' pre-inkubazzjoni ta' mil anqas ġimgħatejn huwa meħtieġ qabel ma jibdew l-istudji tat-trasformazzjoni (ara s-sezzjoni 1.8.3.2).

1.9.1.7. *It-tul tat-test*

Ir-rata u l-passaġġ ta' l-istudji għandhom normalment ma jeċċedux 120 jum ([2]) 4(3) (6) (8), minħabba li wara dan, tnaqqis fl-attività mikrobjali tal-ħamrija mal-mogħdija taż-żmien tkun mistennija f'sistema artifiċjali tal-laboratorju li tkun iżolata mit-tiġdid naturali. Meta meħtieġ għall-karatterizzazzjoni tat-tnaqqis fis-sustanza tat-test u fil-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri, l-istudji jistgħu ikomplu għal perijodi itwal (eż. 6 jew 12 il-xahar) (8). Perijodi itwal ta' inkubazzjoni għandhom ikunu ġustifikati fir-rapport tat-test u akkumpanjati bil-kejl tal-biomassa matul u fit-tmiem ta' dawn il-perijodi.

1.9.2. **It-twettieq tat-test**

Madwar 50 sa 200 g ħamrija (piż xott bażiku) ikun imqiegħed f'kull garafina ta' l-inkubazzjoni (ara l-Figuri 1 u 2 fl-AŻnness 3) u l-ħamrija ittrattata bis-sustanza tat-test b'wieħed mill-metodi deskritti fis-sezzjoni 1.8.2. Meta s-solventi organiċi huma wżati għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, dawn għandhom ikunu mneħħija mill-ħamrija bl-evaporazzjoni. Il-ħamrija tkun kompletament imħallta bi spatula u/jew biċ-ċekċik tal-garafina. Jekk l-istudju jkun imwettaq fil-kondizzjonijiet ta' għalqa mistgħadra, il-ħamrija u l-ilma għandhom ikunu mħallta sewwa wara l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Siltiet żgħar (eż. 1 g) tal-ħamrija ittrattata għandhom ikunu analizzati għas-sustanza tat-test sabiex tkun verifikata distribuzzjoni uniformi. Għal metodu alternattiv, ara hawn taħt.

([1]) Il-kundizzjonijiet ajrobiċi huma dominanti fil-ħamrija tal-wiċċ kif ukoll fis-*sub-surface* tal-ħamrija kif jidher fil-proġett ta' riċerka sponsorjat mill-UE. [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Il-kundizzjonijiet ajrobiċi jistgħu jseħħu biss okkażjonalment meta il-ħamrija tinfaqa' bl-ilma wara xita qawwija jew meta jkun hemm kundizzjonijiet ta' ross li għadu fil-ħliefa fl-għelieqi tar-ross.

([2]) L-istudji ajrobiċi jistgħu jintemmu ħafna qabel 120 jum sakemm l-*ultimate transformation pathway* u l-*ultimate mineralisation* jintlaħqu tajjeb sa dak iż-żmien. It-terminazzjoni tat-test hija possibbli wara 120 jum, jew meta mill-inqas 90 % tas-sustanza għat-test jiġi trasformat, iżda biss jekk mill-inqas 5 % CO_2 jiġi ffurmat.

▼B

It-trattament għandu jkun jikkorrespondi għall-għola rata ta' l-applikazzjoni tal-prodott għall-protezzjoni ta' l-uċuħ kif rakkommandat fl-istruzzjonijiet ta' l-użu u l-inkorporazzjoni uniformi sa fond xieraq fil-għalqa (eż. is-saff ta' fuq,10 cm [1] 5 tal-ħamrija). Per eżempju, għall-kimiċi tat-tħaddir jew tal-ħamrija applikati mingħajr inkorporazzjoni, il-fond xieraq għall-kalkolazzjoni ta' kemm kimika għandha tkun miżjuda ma kull garafina huwa 2,5 cm. Għal ħamrija inkorporata bil-kimiċi, il-fond xieraq huwa l-fond ta' l-inkorporazzjoni speċifikat fl-istruzzjonijiet ta' l-użu. Għal kimiċi ġenerali, ir-rata ta' l-applikazzjoni għandha tkun ikkalkolata fuq il-bażi tar-rotta l-aktar relevanti tad-dħul; per eżempju, meta r-rotta ewlenija tal-dħul fil-ħamrija hija mil-ħama' tad-drenaġġ, il-kimika għandha tkun dożata fil-ħama' f'konċentrazzjoni li tirrefletti l-konċentrazzjoni mistennija tal-ħama' u l-ammont ta' ħama' miżjud mal-ħamrija għandu jirrefletti t-tgħabija normali tal-ħama' mal-ħamrija agrikola. Jekk din il-konċentreazzjoni ma tkunx għola biżżejjed sabiex tidentifika l-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni, inkubazzjoni separata tal-kampjunu tal-ħamrija li jkun fiha rati għoljinm jista jkun ta' għajnuna, imma rati eċċessivi li jinfluwenzaw il-funzjonijiet mikrobjali għandhom ikunu evitati (ara s-sezzjonijiet 1.5 u 1.8.2).

B'mod alternattiv, lott kbit (i.e. 1 sa 2 kg) ta' ġamrija jista jkun ittrattat bis-sustanza tat-test, imħalta bil-galbu f'magna xierqa tat-taħlit u imbagħad trasferita f'porzjonijiet żgħat ta' 50 sa 200 g fil-garafini ta' l-inkubazzjoni (per eżempju bl-użu tal-qsim tal-kampjun). Siltiet żgħar (eż. 1 g) tal-ħamrija ittrattata għandhom ikunu analizzati għas-sustanza tat-test sabiex tkun verifikata distribuzzjoni uniformi. Tali proċedura hija preferibbli la darba tippermetti għal aktar distribuzzjoni uniformi tas-sustanza tat-test fil-ħamrija.

Ukoll, kampjuni mhux trattati huma inkubati permezz ta' l-istess kondizzjonijiet (erobiċi) bħall-kampjuni trattati bis-sustanza tat-test. Dawn il-kampjuni huma wżati għall-kejl tal-biomassa matul u fit-tmiem ta' l-istudji.

Meta s-sustanza tat-test hija applikata mal-ħamrija mdewwba fl-solvent(i) organiċi, kampjuni tal-ħamrija ittrattat bl-istess ammont ta' solvent(i) huma inkubati bl-istess kondizzjonijiet (erobiċi) bħall-kampjuni ittrattati bis-sustanza tat-test. Dawn il-kampjuni huma wżati għall-kejl tal-biomassa, inizjalment, matul u fit-tmiem ta' l-istudji sabiex jivverifikaw l-effetti tas-solvent(i) fuq il-biomassa mikrobjali.

Il-garafini li jkun fihom ħamrija ittratta huma jew imwaħħla mas-sistema tan-nixxija kontinwa deskritta fil-Figura 1 jew magħluqa mal-kolobba ta' l-assorbozzjoni murija fil-Figura 2 (ara l-Anness 3).

([1]) Il-kalkolu tal-konċentrazzjoni inizjali fuq *area basis* bl-użu ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = Il-konċentrazzjoni inizjali fil-ħamrija [$mg.kg^{-1}$]

A = Ir-rata ta' applikazzjoni [$kg.ha^{-1}$]; l = il-ħxuna tas-saff ta' ħamrija ta' l-għalqa [m]; d = *dry bulk* density tal-ħamrija [$kg.m^{-3}$].

Bħala regola, rata ta' applikazzjoni ta' 1 $kg.ha^{-1}$ tirriżulta f'konċentrazzjoni ta' ħamrija ta' bejn wieħed u ieħor 1 $mg.kg^{-1}$ f'saff ta' 10 cm (jekk tassumi *bulk density* ta' 1 g . cm^{-3}).

▼B

1.9.3. **Kampjunar u kejl**

Garafini doppji ta' l-inkubazzjoni huma mneħħija fl-intervalli xierqa tal-ħin u l-kampjuni tal-ħamrija estratti bis-solventi xierqa ta' polarità differenti u analizzati għas-sustanza tatA = Ir-rata ta' applikazzjoni [$kg.ha^{-1}$]; 1 = il-ħxuna tas-saff ta' ħamrija ta' l-għalqa [m]; d = *dry bulk density* tal-ħamrija [$kg.m^{-3}$]. Bħala regola, rata ta' applikazzjoni ta' 1 $kg.ha^{-1}$ tirriżulta f'konċentrazzjoni ta' ħamrija ta' bejn wieħed u ieħor 1 $mg.kg^{-1}$ f'saff ta' 10 cm (jekk tassumi *bulk density* ta' 1 g . cm^{-3}). test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni. Studju iddisinjat sewwa jinkludi garafini suffiċjenti hekk li żewġ garafini jkunu sagrifikati f'kull darba tal-kampjunar. Ukoll, it-taħlitiet ta' l-assorbazzjoni jew il-materjali solidi ta' l-assorbazzjoni ikunu mneħħija f'intervalli varji tal-ħin (intervalli ta' sebat ijiet matul l-ewwel xhar u intervalli ta' 17 il-jum wara xhar) matul u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni ta' kull kampjun tal-ħamrija, u analizzati għall-prodotti volatili. Apparti mil-kampjun tal-ħamrija miġbur direttament wara l-applikazzjoni (jum 9 tal-kampjunar) mill-anqas 5 punti addizzjonali tal-kampjunar għandhom ikunu nklużi. L-intervalli taż-żmien għandhom ikunu magħżula b'tali mod li l-għamla tat-tnaqqis tas-sustanza tat-test u l-għamla tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni jistgħu ikunu stabbiliti (eż. 0, 1, 3, 7 tijiem; 2, 3 ġimgħat; 1, 3, 3 xhur, eċċ.).

Meta jsir użu mis-sustanza tat-test tikkettjata-^{14}C, radjoattività mhux-estrattibbli tkun kwantifikata bil-kombustjoni u l-bilanċ tal-massa tkun ikkalkolata għal kull intervall tal-kampjunar.

Fil-każ ta' l-inkubazzjoni anerobika u mistgħadra, il-fażijiet tal-ħamrija u ta' l-ilma huma analizzati flimkien għas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni jew separatament bil-filtrazzjoni jew biċ-ċentrifugazzjoni qabel l-estrazzjoni u l-analiżi.

1.9.4. **Testijiet Opzjonali**

L-istudju erobiċi, mhux-sterili, f'temperaturi addizzjonali u umidità tal-ħamrija, jistgħu ikunu utili għall-kalkolu ta' l-influwenza tat-temperatura u l-umidità tal-ħamrija fuq ir-rati tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha fil-ħamrija.

Aktar karatterizzazzjoni tar-radjoattività mhux-estrattibbli tista tkun ipprovata bl-użu ta', per eżempju, estrazzjoni superfiċjali likwida.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

L-ammonti tas-sustanza tat-test, tal-prodotti tat-trasformazzjoni, is-sustanżi volatili (fi % biss) u huma mhux-estrattibbli għandhom ikunu murija bħala % tal-konċentrazzjoni inizjalment applikata u, meta xieraq, bħala $mg.kg^{-1}$ ħamrija (ibbażata fuq il-piż tal-ħamrija xorra) għal kull interval tal-kampjunar. Bilanċ tal-massa għandu jkun muri f'persentaġġ tal-konċentrazzjoni inizjalmeent applikata għal kull intervall tal-kampjunar. Preżentazzjoni grafika tal-konċentrazzjonijiet tas-susstanza tat-test kontra ż-żmien tkun tippermetti kalkolu tan-nofs-ħajja tat-trasformazzjoni tagħha jew DT_{50}. Prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri għandhom ikunu identifikati u l-konċentrazzjonijiet tagħhom għandhom ukoll ikunu pinġuti kontra ż-żmien sabiex juru r-rati tal-formazzjoni t-tnaqqis tagħhom. Prodott ta' trasformazzjoni maġġuri huwa kwalunkwe prodott li jirrapreżenta = 10 % tad-doża applikataa fi kwalunkwe waqt matul l-istudju.

Il-prodotti volatili kin ingastati jagħtu xi indikazzjoni tal-potenzal volatili ta' sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha mill-ħamrija.

▼B

Determinazzjonijiet aktar eżatti ta' nofs-ħajja jew tal-valuri DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90} għandhom ikunu akkwistati bl-applikazzjoni xierqa tal-kalkoli bil-mudell kinetiku. Il-valuri ta' nofs-ħajja u DT_{50} għandhom ikunu irrappurtati flimkien mad-deskrizzjoni tal-mudell użat, l-ordni tal-kinetiċi u l-koeffiċjent tad-determinazzjoni (r^2). Kinetiċi ta' l-ewwel ordni huwa preferutu, sakemm $r^2 < 0,7$. Jekk xieraq, il-kalkoli għandhom ukoll ikunu applikati għall-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni. Eżempji ta' mudelli xierqa huma deskritti fir-referenzi 31 sa 35.

Fil-każ ta' studji ta' rati mwettqa f diversi temperaturi, ir-rati tat-trasformazzjoni għandhom ikunu deskritti bħala funzjoni tat-temperatura fi ħdan il-medda tat-temperatura sperimentali bl-użu tar-relazzjoni Arrhenius, bil-formula:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } lnk = 1nA - \frac{B}{T},$$

Meta 1n A u B huma kostanti regrassivi mill-inteċessjoni u ż-żurżieqa, rispettivament, tal-linja ta' l-aħjar posizzjoni ġenerata minn regressjoni lineari 1n k kontra 1/T, k hija r-rata kostanti fit-temperatura t u T hija t-temperatura fi Kelvin. Attenzjoni għandha tingħata għall-medda limitata tat-temperatura li fiha ir-relazzjoni Arrehenius tkun valida fil-każ tat-trasformazzjoni li tkun irregolata bl-azzjoni mikrobjali.

2.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Għalkemm l-istudji huma mwettqa f'sistema artifiċjali tal-laboratorju, ir-riżultati jkunu jippermettu kalkolu tar-rata tat-traformazzjoni tas-sustanza tat-test u wkoll tar-rata tal-formazzjoni u tat-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni skond il-kondizzjonijiet fl-għalqa (36)(37).

Studju tal-passaġġ tat-trasformazzjonni tas-sustanza tat-test jipprovdi informazzjoni dwar il-mezz li bih is-sustanza aapplikata hija strutturament mibdula fil-ħamrija bir-razzjoni kimika u mikrobjali.

3. **RAPPORTAĠĠ**

RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi:

Is-sustanza tat-test:

— l-isem komuni, l-isem kimiku, in-numru CAS, il-formula strutturali (bl-indikazzjoni tal-posizzjoni tat-tikketti meta materjal radjo-tikkettjat ikun użat) u l-propjetajiet fiżiċi-kemikali relevanti (ara s-sezzjoni 1.5);

— il-purità (l-impuritajiet) tas-sustanza tat-test;

— il-purità tar-radjokimika tal-kimika tikkettjata u l-attività speċifika (meta xieraq);

Sustanzi ta' referenza:

— l-isem kimiku u l-istruttura tas-sustanzi ta' referenza kif użati għall- karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodott tat-trasformazzjoni;

Ħamrija tat-test:

— dettalji tas-sit tal-ġbir;

— id-data u l-proċedura tal-kampjunar tal-ħamrija;

▼B

— il-proprjetajiet tal-ħamrija, bħalma huma l-pH, il-kontenut karbonju organiku, it- *texture* (% ramel, % ħama, % tafal), *cation exchange capacity, bulk density*, il- karatteristika tar-ritenzjoni ta' l-ilma, u l-bijomass mikrobjali;

— it-tul tal-ħażna tal-ħamrija u l-kondizzjonijiet tal-ħażna (jekk maħżuna);

Kondizzjonijiet tat-test:

— id-dati tat-twettieq ta' l-istudji;

— l-ammont tas-sustanza tat-test applikata

— is-solventi użati u l-metodu ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;

— il-piż tal-ħamrija inizjalment ittrattata u kampjunata matul kull interval għall-analiżi;

— deskrizzjoni tas-sistema użata għall-inkubazzjoni;

— rati tan-nixxijiet ta' l-arja (għal sistemi biss ta' nixxija kontinwa);

— it-temperatura ta' l-apparat sperimentali;

— il-kontenut ta' l-umidità tal-ħamrija matul l-inkubazzjoni;

— il-biomassa mikrobjali inizjali, matul u fit-tmiem ta' l-istudji erobiċi;

— pH, il-konċentazzjoni ta' l-ossiġenu u l-potenzal inizjali redox, matul u fit-tmiem ta' l-istudji erobiċi u tal-mistgħadar;

— metodu/i tal-estrazzjoni;

— metodi għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni, fil-ħamrija u l-materjali ta' l- assorbazzjoni;

— in-numru ta' replikati u n-numru ta' kontrolli.

Riżultati:

— riżultat tad-determinazzjoni ta' l-attività mikrobjali;

— ir-repettabbilità u s-sensittività tal-metodi analitiċi wżati;

— ir-rati ta' l-irkupru (% valuri għal studju validu huma mogħtija fis-sezzjoni 1.7.1);

— ir-riżultati tat-tabelli espresssi fi % tad-doża inizjali applikata u bħala $mg.kg_{-1}$ ħamrija (fuq il-bażi ta' piż xott);

— il-bilanċ tal-massa, matul u qrib it-tmiem ta' l-istudji;

— il-karatterizzazzjoni ta' radjoattivita (marbuta) mhux strattibbli jew tar-residwi fil-ħamrija;

— kwantifikazzjoni tal-CO_2 rilaxxat u ta' komposti volatili oħrajn;

— grafika tal-konċentrazzjonijiet tal-ħamrija versus is-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni;

— in-nofs-ħajja jew DT_{50}, DT_{75} u DT_{90} tas-sustanza tat-test u, meta xieraq, dwar il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni li huma inklużi fil-limiti ta' l-affidibilità;

▼B

— kalkolu tar-rata tad-degradazzjoni abjotika permezz ta' kondizzjonijiet sterili;

— kalkolu tal-kinetiċi tat-trasformazzjoni għas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni;

— il-passaġġi proponuti tat-trasformazzjoni, meta xieraq;

— diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;

— dettalji ġenerali (i.e. kromatogrammi tal-kampjun, kampjun tar-rati tal-kalkoli tat-trasformazzjoni u l-mezzi użati għall-identifikazzjoni tal-prodotti tat-traformazzjoni).

4. **REFERENZI**

(1) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil -Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass -Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In "Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz -Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

ANNESS I

TENSJONI TA' L-ILMA, KAPAĊITÀ TA' L-GĦALQA (FC) U L-KAPAĊITÀ TAŻ-ŻAMMA TA' L-ILMA (WHC) [1]

L-għoli tal-kolonna ta' l- ilma [cm]	pF [a]	bar [b]	Rimarki
10^7	7	10^4	Ħamrija xotta
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Il-punt tal-mitbiela
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Il-medda tal kapaċità ta' l-għalqa [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (approsimazzjoni)
1	0	0,001	Ħamrija mistgħadra bl-ilma

[a] pF = log ta' cm kolonna ta' l-ilma.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Jikkorrispondi għal kontenut ta' ilma ta' bejn wieħed u ieħor 10 % f'ramel, 35 % f' *loam* u 45 % f'tafal.
[d] Il-kapaċità ta' l-għalqa mhix kostanti iżda tvarja bit-tip ta' ħamrija bejn pF 1,5 u 2,5.

It-tenzjoni ta' l-ilma hija mkejla fi cm tal-kolonna ta' l-ilma jew fi bar. Minħabba il-medda kbira tat-tenzjoni tal-ġbid, din hija espressa sempliċement bħala valur pF li huwa ekwivalenti għal-logaritmu ta' cm kolonna ta' l-ilma.

Il-kapaċità ta' l-għalqa hija definita bħala l-ammont ta' ilma li jista jkun maħżun kontra l-gravità minn ħamrija naturali, jumejn wara l-itwal perijodu ta' xita jew wara irrigazzjoni suffiċjenti hija determinata f'ħamrija mhux imqallba, in situ fil-għalqa. Il-kejl hu b'ħekk mhux applikabbli għall-kampjuni tal-ħamrija imqallba fil-laboratorju. Il-valuri FC li jkunu determinati f'ħamrija mqallba jistgħu juru varjazzjonijiet sistematiċi kbar.

Il-kapaċità taż-żamma ta' l-ilma (Water holding capacity (WHC)) hija determinata fil-laboratorju b'ħamrija mqallba u mhux imqallba bis-saturazzjoni ta' kolonna ħamrija bl-ilma bit-trasport kapillari. Huwa partikolarment utili għal ħamrija mqallba u jista jkun sa 30 % akbar mill-kapaċità ta' l-għalqa (1) Huwa wkoll, b'mod sperimentali, aktar faċli li jkunu determinati b'mod affidabbli l-valuri FC.

Noti

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

ANNESS 2

KONTENUTI TA' L-UMIDITÀ FIL-ĦAMRIJA (g ilma kull 100 g ħamrija xotta) TAD-DIVERSI TIPI TA' ĦAMRIJA MINN PAJJIŻI VARJI

Umidità fil-ħamrija Kontenut fi Tip tal-ħamrija	skond il-pajjiż	Soil		
		WHC	pF = 1,8	pF = 2,5
Ramel	Ġermanja	28,7	8,8	3,9
Ramel Tafli	Ġermanja	50,4	17,9	12,1
Ramel Tafli	Żvizzera	44,0	35,3	9,2
Ħama' taflija	Żvizzera	72,8	56,6	28,4
Tafal biċ-ċappa	Brażil	69,7	38,4	27,3
Tafal biċ-ċappa	Ġappun	74,4	57,8	31,4
Tafal imrammel	Ġappun	82,4	59,2	36,0
Ħama' taflija	USA	47,2	33,2	18,8
Tafal imrammel	USA	40,4	25,2	13,3

▼B

ANNESS 3

Figura 1

Eżempju ta' apparat *flow-through* għall-istudju tat-trasformazzjoni tal-kemikali fil-ħamrija ([1]) ([2])

1: valvola tal-labra

2: flixkun tal-ħasil tal-gass li jkun fih l-ilma

3: ultra-membrana (kondizzjonijiet sterili biss), daqs tal-pori 0.2 µm

4: garafina tal-metaboliżmu tal-ħamrija (mifquha bl-ilma biss għall-kondizzjonijiet anerobiċi u mistgħadra)

5: nassa ta' l-etilin glikol għal komposti volatili ta' l-ossiġenu

6: nassa ta' l-aċidu sulfuriku għal komposti volatili alkalini

7, 8: nassa ta' l- idrossidu tas-sosju għal CO_2 & aċidi oħrajn volatili

9: arloġġ tan-nixxija.

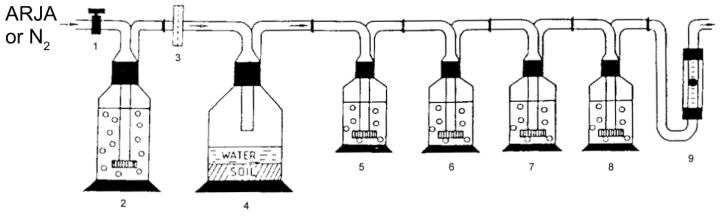
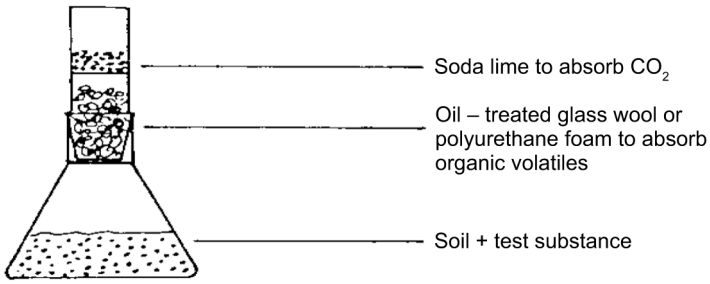


Figura 2

Eżempju ta' garaffina tat-tip *biometer* għall-istudju tat-trasformazzjoni tal-kemikali fil-ħamrija ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. **TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIS-SEDIMENT TAS-SISTEMI AKWATIĊI**

1. **METODU**

Dan il-Metodu tat-Test huwa replika għal OECD TG 308 (2002)

1.1. INTRODUZZJONI

Il-kimiċi jistgħu jidħlu fl-ilmijiet tal-wiċċ, kemm baxxi u kemm fil-fond b'tali rotat bħala applikazzjoni diretta, skular tat-tbexxix, skular, soffija, drenaġġ, disposizzjoni ta' l-iskart, industria, effluwent domestiku jew agrikolu u d-deposizzjoni atmosferika. Dan il-Metodu ta' test jiddeskrivi l-metodu tal-laboratorju sabiex jassessja t-trasformazzjoni erobika u anerobika tal-kimiċi organiċi fis-sistema tas-sediment akwatiku. Dan il-Metodu tat-test huwa ibbażat fuq Linji ta' Gwida eżistenti (1) (2) (3) (4) (5) (6). Laqgħa ta' Ħidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Ħamrija/Sediment li nżammet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (7) qablet dwar in-numru u t-tip ta' ħamrija għall-użu f'dan it-test. Il-Laqgħa ta' Ħidma kienet ukoll għamlet rakkommandazzjonijiet li jirrigarjaw il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija, ibbażari fuq il-Linja ta' Gwida ISO (8). Tali studji huma meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati fil-ħamrija jew li huma pjuttost li jilħqu l-ambjent tal-ħamrija.

Il-kondizzjonijiet fis-sistemi tas-sedeiment akwatiku naturali ta' spiss huma erobiċi fil-faża ta' l-ilma tal-wiċċ. Is-saff tal-wiċċ tas-sediment jista jkun jew erobiku jew anerobiku, waqt li sediment aktar fond, normalment ikun anerobiku. Sabiex ikunu inklużi dawn il-possibbiltajiet kollha, iż-żewġ testijiet erobiċi u anerobiċi huma deskritti f'dan id-dokument. It-test erobiku jistimula kolonna erobika ta' l-ilma fuq saff ta' sediment erobiku li jkun fil-qiegħ b'xaqliba anerobika. It-test anerobiku jistimula sistema kompleta tas-sediment-ta'-l-ilma anerobiku. Jekk iċ-ċirkostanzi jindikaw li huwa meħtieġ li jkun hemm devjazzjoni sinifikanti minn dawn ir-rakommandazzjonijiet, per eżempju bl-użu tal-qalba tas-sediment jew tas-sedimenti li jistgħu kienu ġew esposti għas-sustanza tat-test, metodi oħrajn huma disponibbli għal dan l-iskop (9).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Standard International (SI) units (unitajiet tan-Norma Internazzjonali) għandhom ikunu wżati fi kwalunkwe każ.

Is-sustanza tat-test: Kwalunkwe sustanza, sew jekk kompost oriġinali jew il-prodotti relevanti tat-trasformazzjoni.

Prodotti tat-trasformazzjoni: Is-sustanzi kollha li jirriżultaw mir-reazzjonijiet tat-trasformazzjoni biotiċi jew abiotiċi tas-sustanza tat-test, inklużi iċ-CO_2 u l-prodotti li huma marbuta mar-residwi.

Residwi marbuta: "Residwi marbuta" tirrapreżemnta komposti fil-ħamrija, pjanti jew annimali, li jippersistu fil-matriċi fil-għamla ta' sustanza oriġinali jew tal-prodotti metaboliti/trasformazzjoni wara l-estrazzjoni. Il-metodu ta' l-estrazzjoni m'għandux sostanzjalment jibdel il-komposti nfushom jew l-istruttura tal-matriċi. In-natura tar-rabta tista tkun kjarifikata parzjalment bil-metodi ta' l-estrazzjoni tat-tibdil-tal-matriċi u b'tekniċi analitiċi sofistikati. Sal-lum, per eżempju, ir-rabtiet kovalenti joniċi u sorptivi, kif ukoll l-ingassar, kienu ġew identifikati b'dan il-mod. Ġeneralment, il-formazzjoni tar-residwi marbuta tnaqqas il-bioaċċessibbiltà u l-biodisponabbiltà sinifikament (10) (Modifikati minn IUPAC 1984 (11)).

▼B

Trasformazzjoni erobika: (ossidazzjoni): Reazzjonijiet li jseħħu fil-preżenza ta' l-ossiġenu molekulari (12).

Trasformazzjoni anerobika: (tnaqqis): Reazzjonijiet li jseħħu fl-esklużjoni ta' l-ossiġenu molekulari (12).

Ilmijiet naturali: Huma l-ilmijiet tal-wiċċ akkwistati min għadajjar, xmajjar, nixxijat, eċċ.

Sediment: Hija taħlita ta' kostitwenti kimiċi minerali u organiċi, dawn ta' l-aħħar ikun fihom komposti ta' kontenut għoli tal-karbonju u n-nitroġenu u ta' piżijiet molekulari għoljin. Dan huwa depożitat b'ilma naturali u jifforma interfaża ma dak l-ilma.

Mineralizzazzjoni: Hija d-degradazzjoni kompleta ta' kompost organiku lejn CO_2, H_2O permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, u CH_4, CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet anerobiċi. Fil-kuntest ta' dan il-metodu tat-test, meta kompost bit-tikketta-14C ikun użat, il-mineralizzazzjoni tfisser dehradazzjoni estensiva li matula atomu tal-karbonu tikkettjat ikun ossidizzat bil-rilaxx ta' l-ammont xieraq ta' $^{14}CO_2$ jew $^{14}CH_4$

Half-life $t_{0,5}$, huwa l-ħin meħtieġ għal 50 % trasformazzjoni tas-sustanza tat-test meta t-trasformazzjoni tista tkun deskritta bil-kinetiċi ta' l-ewwel ordni; din hija independenti mill-konċentrazzjoni.

DT_{50} (Għibien Ħin 50): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 50 %.

DT_{75} (Għibien Ħin 75): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 75 %.

DT_{90} (Għibien Ħin 90): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 90 %.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu wżati għall-karetterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti bil-metodi spektroskopiċi u kromatografiċi.

1.4. INFORMAZZJONI DWARIS-SUSTANZATAT-TEST

Sustanza tat-test mhux-ittikkettjata jew ittikkettjata tista tkun użata sabiex tkejjel ir-rata tat-trasformazzjoni, għalkemm materjal tikkettjat huwa preferut. Il-materjal tikkettjat huwa meħtieġ għall-istudju tal-passaġġ tat-trasformazzjoni u sabiex ikun stabbilit il-bilanċ tal-massa. Tikkettjar-14C huwa rakkomandat imma l-użu ta' iżotopi oħrajn bħal ma huma ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, jistgħu wkoll ikunu utili. Sa kemm huwa possibbli, it-tikketta għandha tkun imqiegħda fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekolu ([1]) 6. Il-Purità tal-kimika u/jew tar-radjo-kimika tas-sustanza tat-test għandha tkun mill-anqas 95 %.

Qabel jitwettaq it-test, l-informazzjoni li ġejja, dwar is-sustanza tat-test, għandha tkun disponibbli:

(a) solubilità fl-ilma (il-Metodu A.6);

(b) solubilità f'solventi organiċi;

(ċ) pressjoni tal-fwar (il-Metodu A.4) u l-liġi kostanti Henry;

([1]) Per eżempju, jekk is-sustanza jkun fiha ċirku wieħed, l-ittikketjar fuq dan iċ-ċirku huwa meħtieġ. Jekk is-sustanza tat-test ikun fiha żewġ ċrieki jew iktar, studji separati jistgħu jkunu meħtieġa għall-evalwazzjoni tax-xorti ta' kull ċirku ittikkettjat u sabiex tinkiseb l-informazzjoni adattata fuq il-formazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni.

▼B

(d) il-koeffiċjent tal-qsim n–oktano/ilma (il-Metodu A.8);

(e) koeffiċjent ta' l-adsorbazzjoni (K_d, K_f jew K_{oc}, meta xieraq) (il-Metodu C.18);

(f) idrolisi 9il-Metodu C.7);

(g) kostant tad-disassoċjazzjoni (pKa) (Linja ta' Gwida OECD 112) (13);

(h) struttura kemikali tas-sustanza tat-test u l-posizzjoni tat-tikketta(i)-iżotpika, jekk applikabbli.

Nota: It-temperatura li fiha dawn il-kejl kienu saru għandha tkun rappurtata.

Informazzjoni utili oħra tista tinkludi dettalji dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test fuq il-mikroorganiżmi, dettalji diġa disponibbli u/jew biodegradabbiltà inerenti, u dettalji dwar trasformazzjoni erobika u anerobika fil-ħamrija.

Il-metodi analitiċi (inklużi l-metodi ta' l-estrazzjoni u tat-tindif) għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tat-trasformazzjoni tal-prodotti tagħha, għandhom ikunu disponibbli.

1.5. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-metodu deskritt f'dan it-test jutilizza sistema tas-sediment akwatiku erobiku u anerobiku (ara l-Anness 1) li tippermetti:

(i) il-kejl tar-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test f'sistema ta' sediment ta' l-ilma,

(ii) il-kejl tar-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test fis-sediment,

(iii) il-kejl tar-rata tal-mineralizzazzjoni tas-suistanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha (meta tikkettjata-C14, is-sustanza tat-test hija użata),

(iv) l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni fil- fażijiet ta' l-ilma u tas-sediment, inkluż il-bilanċ tal-massa (meta sustanza tat-test, tikkettjata, tkun użata),

(v) il-kejl tad-distrubuzzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha bejn iż-żewġ fażijiet matul perijodu ta' l-inkubazzjoni fid-dlam (sabiex ikun evitat, per eżempju, it-tnibbit ta' l-alga) f'temperatur kostanti. Il-valuri nofs-ħajja, DT_{50}, DT_{75} and DT_{90} huma determinati meta l-informazzjoni hekk teħtieġ, imma m'għandhiex tkun estrapolata wisq lura lejn perijodu sperimentali (ara s-sezzjoni 1.2).

Mill-anqas żewġ sedimenti u l-imijiet assoċċjati tagħhom huma meħtieġa għaż-żewġ studji erobiċi u anerobiċi rispettivament 97). B'dana kollu, jista jkun hemm każi meta aktar minn żewġ sedimenti għandhom ikunu wżati, per eżempju, dwar kimika li tista tkun preżenti f'ambjenti ta' l-ilma frisk u/jew marini.

▼B

1.6. L-APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

Il-metodu huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi kollha (mhux ittikkettjati jew radjotikkettjati) li dwarhom metodu analitiku b'eżattezza u sensittività suffiċjenti huma disponibbli. Dan huwa applikabbli għal komposti kemm xejn volatili, mhux volatili, li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. It-test m'għandux ikun applikat lejn kimiċi li huma ferm volatili minn ġewwa l-ħamrija (eż., fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistgħux jinżammu fil-ħamrija skond il-kondizzjonijiet sperimentali ta' dan it-test.

Dan il-metodu kien ġie applikat, s'issa, sabiex jistudja t-trasformazzjoni f'ilma frisk u sedimenti, imma l-prinċipju jista wkoll ikun applikat għal sistemi estwarini/marini. Dan mhux adattat biex jistimu kondizzjonijiet f'ilma mexxej (eż. xmajjar) jew fil-baħar miftuħ.

1.7. KRITERJA TAL-KWALITÀ

1.7.1. **Irkupru**

L-estrazzjoni u l-analiżi ta', mill-anqas, nofs il-kampjunu duplikati ta' l-ima u tal-ħamrija, wara ż-żieda tas-sustanza tat-test, tagħti l-ewwel indikazzjoni tar-repetabbiltà tal-metodu analitiku u ta' l-uniformità tal-proċedura ta' l-applikazzjoni għas-sustanza tat-test. L-irkupri fi stadji aktar tard ta' l-esperimenti huma mogħtija bil-bilanċi rispettivi tal-massa (meta materjal tikkettjat ikunu wżat). L-irkupri għandhom ikunu fil-medda ta' minn 90 % sa 110 % tal-kimiċi ittikkettjati (6) u minn 70 % sa 110 % għal kimiċi mhux ittikkettjati.

1.7.2. **Ir-repettabbiltà u s-sensittività tal-metodu analitiku**

Ir-repetabbilità tal-metodu analitiku (eskluża l-peffiċjenza ta' l-estrazzjoni inizjali) sabiex tkun kwantifikata s-sustanza tat-test u tat-trasformazzjoni tal-prodotti tista tkun verifikata b'analiżi duplikata ta' l-istess estratt tal-ħamrija, inkubat għal tul ta' żmien biż-żejjed għall-formazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti.

Il-limitu ta' sejbien (limit of detection (LOD)) tal-metodu analitiku għas-sustanza tat-test u għat-trasformazzjoni tal-prodotti għandu jkun mill-anqas 0,01 $mg.kg^{-1}$ ħamrija (bħala sustanza tat-test) jew 1 % tad-doża applikata, liema minnhom hija l-anqas. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni (limit of quantification (LOQ)) għandu wkoll ikun speċifikat.

1.7.3. **L-eżatezza tad-dettalji tat-trasformazzjoni**

Analiżi regressiva tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-ħin, tagħti informazzjoni xierqa dwar l-affiddabbilità tal-kurva tat-trasformazzjoni u tippermetti il-kolkolu tal-limiti affidabbli ta' nofs-ħajjiet (fil-każ ta' psewdo kinetiċi ta' l-ewwel ordni) jew il-valuri DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90}

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.8.1. **Sistema u apparat tat-test**

L-istudju għandu jkun jkun imwettaq fl-kontenuturi tal-ħġieġ (eż. flixkien, tubi taċ-ċentrifuga), sakemm informazzjoni preliminari (bħal ma huwa l-koeffiċjent tal-qasmi n-oktanol-ilma, id-dettaltji tas-sopzjoni, eċċ.) tkun tindika li s-sustanza tat-test tista tkun teħel mal-ħġieġ, f'liema każ, materjal alternattiv (bħala ma hu t-teflon) għandu mnejn ikun ikkonsidrat. Meta s-sustanza tat-test hija magħrufa li teħel mal-ħġieġ, jista jkun possibbli li titnaqqas din il-problema bl-użu ta' wieħed jew aktar minn dawn il-metodi li ġejjin:

▼B

— iddetermina l-massa tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni kif sorbiti mal-ħġieġ;

— assigura ħasla bis-solvent ta' l-oġġetti kollha tal-ħġieġ fit-tmiem tat-test;

— l-użu ta' prodotti formulati (ara wkoll is-sezzjoni 1.9.2);

— uża ammont miżjud tal-ko-solvent bħala żieda tas-sustanza tat-test mas-sistema; jekk ko-solvent ikun użat, dan għandu jkun ko-solvent li ma jkunx idewweb is-sustanza tat-test.

Eżempji ta' apparat xieraq, i.e. sistemi tal-ħġieġ b'nixxija kontinwa u tat-tip biometriku, huma murija fl-Annessi 2 u 3, rispettivament (14). Sistemi utili oħrajn ta' l-inkubazzjoni huma deskritti fir-referenza 15. Id-disinn ta' l-apparat sperimentali għandu jippermetti l-iskambju ta' l-arja jew tan-nitroġenu u tal-prodotti volatili li jkunu ġew maqbuda. Il-qisien ta' l-apparat għandu jkun tali li l-ħtiġiet tat-test ikun hemm konformità magħhom (ara s-sezzjoni 1.9.1). Il-ventilazzjoni tista tkun ipprovduta jew bi bżieżaq ġentili jew bill-passaġġ ta' l-arja jew tan-nitroġenu minn fuq wiċċ l-ilma. F'dan il-każ ta' l-aħħar, taħwid ġentili ta' l-ilma minn fuq jista jkun rakkommadabbli għal distribuzzjoni aħjar ta' l-ossiġenu jew tan- nitroġenu fl-ilma. Arja ħielsa minn CO_2 m'għandhiex tkun użata minħabba li dan jirriżulta f'żidiet fil-pH ta' l-ilma. Fi kwalunkwe każ, it-tqallib tas-sediment mhux mixtieq u għandu jkun evitat, sa kemm ikun possibbli. Kimiċi kemm xejn volatili għandhom ikunu ittestjati f'sistema tip-ta'-barometru b'taħwid ġentili tal-wiċċ ta' l-ilma. Kontenituri magħluqa, bi spazju fil-wiċċ ta', jew l-arja atmosferika jew tan-nitroġenu, u fjali interni għal-qbil ta' prodotti volatili, jistgħu wkoll ikunu wżati (16). Skambju regolari tal-gass fl-ispazju huwa meħtieġ fit-test erobiku sabiex jikkumpensa għall-konsum ta' l-ossiġenu mill-biomassa.

Nasses xierqa għall-ġbir tal-prodotti volatili tat-trasformazzjoni jinkludu, imma mhux ristertti għal, 1 $mol.dm^{-3}$ taħlitiet ta' l-idrossidu tal-putassa jew ta' l-idrossidu tas-sodju, għad-diossidu tal-karbonju ([1]) 7u tal-glikol etiliniku, l-etanolamin jew 2 % paraffin fi xilene għal komposti organiċi. Volatili ffurmati permezz ta' kondizzjonijiet anerobiċi, bħal ma huwa l-metanju, jistgħu ikunu miġbura, per eżempju, b'għarbiel molekulari. Tali volatili jistgħu ikunu maħruqa, per eżempju, iċ-CO_2 li jgħaddi mill-gass matul tubu tal-kwart mimli bi CuO f'temperatura ta' 900 ^oC u li jiġbor iċ- CO_2 iffurmat f'assorbatur bl-alkali (17).

Strumentazzjoni tal-laboratorju għal analiżi kimika tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni hija meħtieġa (i.e. kromatografija likwida tal-gass (GLC), kromatografija likwida ta' mġieba qawwija (HPLC), kromatografija tas-saff irqieq (TLC), spektroskopju tal-massa (MS), spektroskopju tal-kromatografija-tal-massa tal-gass (GC-MS), spektrometru tal-kromatografija tal-massa likwida (LC-MS), reżonanza manjetika nukleari (NMR), eyc.) inklużi s-sistemi tas-sejbien għal kimiċi radjotikkettjati jew mhux tikkettjati, kif xieraq. Meta materjal radjo-tikkettjat ikun użat bħala għadd tax-xintillazzjoni tal-likwidu u ossidizzatur tal-kombustjoni (għall-kombustjoni ta' kampjuni tas-sediment qabel l-analiżi tar-radjo-attività) ikun ukoll meħtieġ.

Apparat normali ieħor tal-laboratorju, għal determinazzjonijiet fiżiko-kimiċi u bioloġiċi (ara s-sezzjoni Tabella 1, is-sezzjoni 1.8.2.2(l-oġġetti tal-ħġieġ, il-kimiċi u r-reaġenti huma meħtieġa, kif xieraq.

([1]) Bħalma dawn is-soluzzjonijiet ta' abżorpzjoni alkalini jassorbu wkoll id-dijossidju tal-karbonju mill-arja ta' ventilazzjoni u li iffurmati peremzz ta' respirazzjonni f'esperimenti ajrobiċi, għandhom jiġu mibdula f'intervali regolari sabiex tiħi evitata is-saturazzjoni tagħhom u b'hekk it-telf tal-kapaċita' ta' l-abżorpzjoni tagħhom

▼B

1.8.2. **L-għażla u n-numru ta' sedimenti akwatiċi**

Is-siti tal-kampjunar għandhom ikunu magħżula skond l-iskop tat-test, f'xi sitwazzjoni partikolari. Fl-għażla tas-siti tal-kampjunar, l-istorja fl-isfond, agrikola, indistriali jew domestika dwar il-wesgħa tal-ġbir u ta' l-ilmijiet fin-naħa ta' fuq, għandhom ikunu ikkunsidrati. Is-sedimenti m'għandhomx ikunu wżati jekk ikunu ġew kontaminati bis-sustanza tat-test jew bl-istrutturi analogi tagħha matul l-4 snin preċedenti.

1.8.2.1. L-għażla tas-sediment

Żewġ sedimenti huma normalment użati għall-istudju erobiċi (7). Iż-żewġ sedimenti magħżula għandhom ikunu differenti fir-rigward tal-kontenut tal-karbonju organiku u fil-formazzjoni tagħhom. Sediment wieħed għandu jkollu kontenut għoli ta' karbonju organiku (2,5-7,5 %) u ta' formazzjoni fina, is-sediment l-ieħor għandu jkollu kontut baxx tal-karbonju organiku (0,5-2,5 %) u formazzjoni rozza. Id-differenza bejn il-kontenuti tal-karbonu organiku għandha, normalment, tkun ta' mill-anqas 2 %. "Formnazzjoni fina" hija definita bħala (tafal + ħama') [10] ([1]) 8kontenut ta > 50 % u "formazzjoni rozza" hija definita bħala (tafal + ħama') kontenut ta' < 50 %. Id-differenza fil-kontenut (tafal + ħama') għaż-żewġ sedimenti għandha normalment tkun mill-anqas 20 %. Fil-każi, meta l-kimika tista wkoll tilħaq l-ilmijiet marittimi, mill-anqas waħda mis-sistemi tas-sediment ta' l-ilma għandha tkun ta' oriġini marittima.

Għal studju strettament anerobiku, żewġ sedimenti (inklużi l-imijiet assoċjati tagħhom) għandhom ikunu miġbura minn żoni anerobiċi tal-partijiet ta' l-ilma tal-wiċċ (7). Iż-żewġ fażijiet tas-sediment u ta' l-ilma għandhom ikunu mqanda u ittrasportati bir-reqqa bl-esklużjoni ta' l-ossiġenu.

Parametri oħrajn jistgħu ikunu importanti fil-għażla tas-sedimenti u għandhom ikunu ikkunsidrati fuq il-bażi ta' każ b'każ. Per eżempju, il-medda pH tas-sedimenti tkun importanti għall-kimiċi tat-testijiet li dwarhom trasformazzjoni u/jew sorpzjoni jistgħu ikunu pH-dipendenti. Id-dipendenza-pH tas-sorpzjoni tista tkun riflessa bil-pKa tas-sustanza tat-test.

1.8.2.2. Karatterizzazzjoni tal-kampjuni tas-sedimenti ta' l-ilma

Parametri ewlenija li għandhom ikunu mkejla u inklużi fir-rapport (b'referenza għall-metodu wżat) kemm għall-ilma u għas-sediment, u l-istadju tat-test li fih dawk il-parametri għandhom ikunu determinati, huma miġbura f'sommarju fit-Tabella ta' hawn taħt. Għall-informazzjoni, il-metodi tas-sejbin għad-determinazzjoni ta' dawn il-parametri huma mogħtija fir-referenzi (18) (19) (20) (21).

B'żieda, parametri oħrajn jistħu li jkunu metieġa li jkunu mkejla u nklużi fir-rapport fuq il-bażi ta' każ b'każ (eż. għall-ila frisk: Partiċelli, alkalinità, toqol. Kondittività, NO_3/PO_4 (relattività u valuri individwali); għas-sedimenti: Il-kapaċità ta' l-iskambju tal-jonji, il-kapaċità taż-żamma ta' l-ilma, Il-karbonat, in-nitroġenu u l-fosfru totali; u għas-sistemi marittimi: Salinità). L-analiżi tas-sedimenti u l-ilma għan-nitrat, is-sulfat u l-ħadid bio-disponibbli, u l-ossibbiltà ta' aċċettaturu elettroni oħrajn tista tkun utili fl-assaġġ tal-kondizzjonijiet redox, speċjalment b'relazzjoni mat-trasformazzjoni anerobika.

([1]) Tafal u ħama) hija il-frazzjoni minerali tas-sediment bid-daqs tal-partiċella ta' < 50 μm.

▼B

Parametri tal-kejl għall-karatterizzazzjoni tal-kampjunu fis-sediment ta' l-ilma (7)(22)(23)

Parametru	Stadju tal-proċedura tat-test					
	Kampjun ta' l-għalqa	Wara t-tqandil	Bidu ta' l-akklamit - azzjoni	Bidu tat-test	Matul it-test	Tmiem tat-test
Ilma						
Oriġini/sorsi	x					
temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
O_2 konċentrazzjoni (*)	x		x	x	x	x
Potenzal Redox (*)			x	x	x	x
Sediment						
Oriġini/sorsi	x					
Il-fond tas-saff	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuzzjon i tad-daqs tal-partiċelli		x				
TOC		x	x	x		x
Biomassa mikrobjali (*)		x		x		x
Potenzal Redox (**)	Osservazzjonijiet (lewn/riħa)		x	x	x	x

(*) Riżultati tar-riċerka riċenti wrew li il-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal- *water oxygen* l-ossiġnu ta' l-ilma u tal-potenzjalitajiet *redox* m'għandhomx valur la mekkanistiku u lanqas ta' tbassir fejn għandu x'jaqsam it-tkabbir u l-iżvilupp tal-popolazzjoni mikrobjali fl-ilmijiet tal-wiċċ. (24) (25).

(**) Id-determinazzjoni tad-domanda bijokemikali ta' l-ossiġnu (BOD, fit-teħid tal-kampjuni ta' l-għelieqi, fil-bidu u fi tmiem it-test) jistgħu jkunu għodod aħjar għall-interpretazzjoni u l-evalwazzjoni tal-bijotrasformazzjoni ajrobika tar-rati u r-rotot ajrobiċi (26), il-metodu ta' fumigazzjoni (27) jew *plate count measurements* (eż. il-batterja, l-*actinomycetes, fungi* u l-kolonji totali) għal studji ajrobiċi; ir-rata tal-*methanogenesis* għal studji anajrobiċi.

1.8.3. **Ġbir, Tqandil u Ħażna**

1.8.3.1. *Il-ġbir*

L-abbozz tal-gwida ISO dwar il-kampjunar tas-sediment tal-qiegħ 98 għandu jkun użat għall-kampjunar tas-sediment. Kampjuni tas-sediment għandhom ikunu miġbura mis-saff intier ta' fuq, 5 sa 10 cm, tas-sediment. L-ilma assoċjat għandu jkun miġbur mill-istess sit jew lokalità u fl-istess waqt bħas-sediment. Għal studju anerobiku, il-ġbir tal-kampjuni tas-sediment u ta' l-ilma assoċjat u t-trasportazzjoni tagħhom għandu jkun bl-esklużjomni ta' l-ossiġenu (28) (ara s-sezzjoni 1.8.2.1). Uħud mill-apparati tal-kampjunar huma deskritti fil-litteratura (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Tqandil*

Is-sediment huwa separat mill-ilma permezz tal-filtrazzjoni u s-sediment ikun magħrbel fl-undità minn għarbiel ta' 2 mm bl-użu ta' l-ilma eċċessiv tal-lokalita, li imbagħad ikunu mormi. Imbagħad, ammonti magħrufa ta' sedimenti u ilma huma mħallta fir-relattività mixtieqa (ara s-sezzjoni 1.9.1) f'garafini ta' l-inkubazzjoni u ippreparati għall-perijodu ta' l-akklamizzazzjoni (ara s-sezzjoni 1.8.4). Għal studju anerobiku, il-passi kollha tat-tqandil għandhom iseħħu bl-esklużjoni ta' l-ossiġenu (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Ħażna*

L-użu ta' kampjun frisk tas-sediment u l-ilma huwa ferm rakkommandabbli, imma jekk ħażna tkun meħtieġa, Is-sediment u l-ilma għandhom ikunu magħrbla kif deskritt hawn fuq u maħżuna flimkien, mifqugħa bl-ilma (6-10 cm saff ta' ilma), fid-dlam, fi 4 ± 2 $^{o}C_{4}$ għal massimu ta' [13] ġimghat (7)(8)(23). Il-kampjuni li huma ntiżi għal studji erobiċi għandhom ikunu maħżuna b'aċċess liberu ta' arja 9eż. f'kontenituri miftħa), waqt li dawk għal studji erobiċi bl-esklużjoni ta' l-ossiġenu. L-iffriżar tas-sediment u l-ilma u waqt l-inxif tas-sediment m'għandux iseħħ matul it-trasportazzjoni u l-ħażna.

1.8.4. **Preparazzjoni tal-kampjuni sediment/ilma għat-test**

Perijodu ta' akklamitazzjoni għandu jseħħ qabel iż-żieda tas-sustanza tat-test, b'kull kampjun ta' sediment/ilma jkun miqiegħed fir-reċipjent ta' l-unkubazzjoni li għandu jkun użat għat-test ewlieni, u l-akklamizzazzjoni tkun imwettqa skond l-istess kondizzjonijiet bħal fit-test ta' l-inkubazzjoni (ara s-sezzjoni 1.9.1). Il-perijodu ta' l-akklimizzazzjoni huwa ż-żmien meħtieġ għal stabbilità raġjonevoli tas-sistema kif rifless bil-pH, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu fl-ilma, il-potenzal tar-redox tas-sediment u l-ilma, u l-fażijiet tas-separazzjoni makroskopika. Il-perijodu ta' l-akklamizzazzjoni għandu normalment idem bejn ġimgħa waħda u ġimgħatejn u m'għandux jeċċedi erba' ġimghat. Ir-riżultati tad-determinazzjonijiet imwettqa matul dan il-perijodu għandhom ikunu nlkużi fir-rapport.

1.9. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.9.1. **Kondizzjonijiet tat-test**

It-test għandu jkun imwettaq fl-apparat ta' l-inkubazzjoni (ara s-sezzjoni ċ.8.1) b'relattività tal-volum ta' l-ilma mas-sedimet ta' bejn 3:1 u 4:1, u saff tas-sediment ta' 2,5 cm (± 0,5 cm) [1] 9. Ammont minimu ta' 50 g ta' sediment (bażi ta' piż xott) kull reċipjent ta' l-inkubazzjoni huwa rakkommandat.

It-test għandu jkun imwettaq fid-dlam, b'temperatura kostanti fil-medda ta' 1- sa 30 ^{o}C. Temperatura ta' (20 ± 2) ^{o}C hija xierqa. Meta xieraq, temperatura addizzjonali aktar baxxa (eż. 10 ^{o}C) tista tkun meqjusha fuq il-bażi ta' każ b'każ, jiddependi mill-informazzjoni meħtieġa mit-test. It-temperatura ta' l-inkubazzjoni għandha tkun sorveljata u nkluża fir-rapport.

[1] Studji riċenti wrew li il-ħżin f'temepratura ta' 4 ^{o}C jista' jwassal għal tnaqqis tal-kontenut tal-karbonju organiku tas- sediment li jista' jirriżulta fi tnaqqis ta' l-attivita' mikorbjali (34).

▼B

1.9.2. **It-trattament u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test**

Konċentrazzjoni waħda tal-kimika tat-test hija użata ([1]) . Għall-kimiċi tal-protezzjoni ta' l-uċuġ applikati direttament lejn is-saffi ta' l-ilma, id-doża massima tat-tikketta għandha tkun meqjusa bħala, ir-rata massima ta' l-applikazzjoni ikkalkolata fuq il-bażi taż-żona tal-wiċċ ta' l-ilma fir-reċipjent tat-test. Fil-każi l-oħrajn kollha, il-konċemtrazzjoni li trid tkun użata għandha tkun ibbażata fuq previżjonijiet mill-emissjonijiet ambjentali. Attenzjoni għandha tingħata sabiex tkun assigurata li konċentrazzjoni adekwata tas-sustanza tat-test tkun applikata sabiex tikkaratterizza r-rotta tat-trasformazzjoni u tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni. Jista jkun meħtieġ li jkunu applikati dożi aktar għoljin (eż. 19-il darba) f'sitwazzjonijiet meta l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test ikunu qrib il-limitu tas-sejbien fil-bidu ta' l-istudji u/jew meta prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri ma jkunux faċli li jkunu misjuba meta preżenti fi 10 % tar-rata ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. B'dana kollu, jekk konċentrazzjonijiet għola tat-test huma wżati, dawn m'għandhox ikollhom effett ħażin sinifikanti fuq l-attività mikrobjali tas-sistema ilma-sediment. Sabiex tkun akkwistat konċentrazzjoni kostanti tas-susstanza tat-test fir-reċipjenti ta' qisien differenti, aġġustament tal-kwantità tal-materjal applikat jista jkun meqjus bħala xieraq, ibbażat fuq il-fond tal-kolonna ta' l-ilma fir-reċipjent b'relazzjoni mal-fond ta' l-ilma fl- għalqa (li huwa preżunt li huwa 100 cm, imma fond ieġor jista jkun użat). Ara l-Anness 4 għal eżempju tal-kalkolazzjoni.

Idealment, is-sustanza tat-test għandha tkun applikata bħala taħlita akweja ġewwa l-faži ta' l-ilma tas-sistema tat-test. Jekk ma jkunx jista jsir mod ieħor, l-użu ta' ammonti anqas ta' solventi li jitħaltu ma l-ilma (bħal ma huma l-aċetun, l-etanol) huwa permisibbli għall-applikazzjoni u d-distribuzzjoni tas-sustanza tat-test, imma dan m'għandux jeċċedi 1 % v/v u m'għandux ikollu effeti ħżiena fuq l-attività mikrobjali tas-sistema tat-test. Attenzjoni għandha tingħata fil-ġenerazzjoni tat-taħlita akweja tas-sustanza tat-test – l-użu ta' kolonni ġenerati u t-taħlit minn qabel jista jkun xieraq sabiex tkun assigurata omoġenità kompluta. B'segwiment taż-żieda tat-taħlita akweja mas-sistema tat-test, taħvid ġentili tal-faži ta' l-ilma huwa rakkommandat, li jqanqal is-sediment mill-anqas possibbli.

L-użu ta' prodotti formulati mhux normalment rakkommandat minħabba li l-ingredjenti tal-formulazzjoni jistgħu jaffettwaw is-sustanza tat-test u/jew tal-prodotti tat-trasformazzjoni bejn il-faživiet ta' l-ilma u tas-sediment. B'dana kollu, eż. għal sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu, l-użu ta' materjal formulat jista jkun alternattiva xierqa.

In-numru ta' reċipjenti ta' l-inkubazzjoni jiddependi min-numru ta' drabi tal-kampjunar (ara s-sezzjoni 1.9.3). Numru suffiċjenti tas-sistemi tat-test għandhom ikunu nklużi sabiex żewġ sistemi jistgħu ikunu sagrifikati f'kull waqt tal-kampjunar. Meta l-unitajiet tal-kontroll ta' kull sistema tas-sediment akwatiku jkunu wżati, dawn m'għandhomx ikunu ittrattati bis-sustanza tat-test. L-unitajiet tal-kontroll jistgħu ikunu wżati għad-determinazzjoni tal-biomassa mikrobjali tas-sediment u tal-karbonju organiku totali ta' l-ilma u tas-sediment fit-tmiem ta' l-istudju. Iż-żewġ unitajiet tal-komntroll (i.e. unità tal-kontroll waħda ta' kull sediment akwatiku) jistgħu ikunu wżati sabiex jissorveljaw il-parametri meħtieġa fis-sediment u fl-ilma matul il-perjodu ta' l-akklamitizzazzjoni (ara t-Tabella fis-sezzjoni 1.8.2.2). Żewġ unitajiet addizzjonali tal-kontroll għandhom ikunu nklużi fil-każ li sustanza tat-test tkun applikata permezz ta' solvent li jkejjel l-effetti ħżiena fuq l-attività mikrobjali tas-sistema tat-test.

([1]) Test bit-tieni konċentrazzjoni jista' jkun utili għall- kemikali li jilħqu l-ilmijiet tal-wiċċ permezz ta' *entry routes* differenti u dan jwassal għal konċentrazzjonijiet differenti b'mod sinifikattiv, sakemm l-iktar konċentrazzjoni baxxa tista' tkun analizzata b'kemm jista' jkun eżattezza.

▼B

1.9.3. **It-tul taż-żmien u l-kampjunar tat-test**

It-tul ta' l-esperiment m'għandux normalment jeċċedi 100 jum (6), u għandu jkompli sa kemm il-passaġġ tal-gradazzjoni u l-għamla tad-distrubuzzjoni ta' l-ilma/sediment tkun stabbilita jew meta 90 % tas-sustanza tat-test tkun dissipata fit-trasformazzjoni u/jew il-volatilizzazzjoni. In-numru ta' waqtiet tal-kampjunar għandhom ikunu mill-anqas sitta (inkluż il-ħin żero), bi studju preliminarji voluntarju (ara s-sezzjoni 1.9.4) ikunu wżat sabiex tkun stabbilit r-regola xierqa tal-kampjunar u tat-tul tat-test, sakemm informazzjoni suffiċjenti ma tkunx diġa disponibbli dwar is-sustanza tat-test minn studju preċendenti. Għal sustanzi tat-test idrofobiċim punti addizzjonali tal-kampjunar matul il-perijodu inizjali ta' l-istudju jistgħu ikunu meħtieġa sabiex tkun determinata r-rata tad-distribuzzjoni bejn il-fażijiet ta' l-ilma u tas-sediment.

Filwaqtiet xierqa tal-kampjunar, ir-reċipjenti kollha ta' l-inkubazzjoni (dupplikat) huma mneħħija għall-analiżi. Is-sediment u l-ilma tal-wiċċ huma analizzati separatament [1] 1. L-ilma tal-wiċċ għandu jkun imneħħi bil-galbu b'ċaqlieq mill-anqas tas-sediment. L-estrazzjoni u l-karatterizzazzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni għandhom isegwu l-proċeduri analitiċi xierqa. Attenzjoni għandha tingħata għat-tneħħija tal-materjal li jkun jkun ġie assorbit mar-reċipjent ta' l-inkubazzjoni jew mat-tibi ta' l-interkonnessjoni wżati li jaqbdu l-volatili.

1.9.4. **Test preliminarju voluntarju**

Jekk ir-regolazzjoni tat-tul u tal-kampjunar ma jistgħux ikunu ikkalkolati minn studju relevanti oħrajn dwar is-sustanza tat-test, studju preliminari voluntarju jista jkun meqjus bħala xieraq, li għandu jkun imwettaq bl-użu ta' l-istess kondizzijonijiet tat-test proponuti għall-istudju definittiv. Kondizzjonijiet sperimentali relevanti u r-riżultati mit-test preliminarju, jekk imwettaq, għandhom ikunu rraportati fil-qosor.

1.9.5. **Kejl u analiżi**

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u l-prodotti tat-trasformazzjoni f'kull waqt tal-kampjunar fl-ilma u fis-sediment għandhom ikunu mkejla u rraportati (bħala konċentrazzjoni u bħala persentaġġ ta' l-applikat). Ġeneralment, il-prodotti tat-trasformazzjoni misjuba fl-≥10 % tar-radjoattività applikata fis-sistema totali ta' ilma-sediment fi kwalunkwe waqt tal-kampjunar għandhom ikunu identifikati, sakemm ma jkunx raġjonevolment ġustifikat mod ieħor. Il-prodotti tat-trasformazzjoni li dwarhom il-konċentrazzjonjiet huma kontinwament miżjuda matul l-istudju għandhom ukoll ikunu ikkonsidrati għall-identifikazzjoni, anki jekk il-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jkunux jeċċedu l-limitu mogħti hawn fuq, minħabba li dan jista jindika persistenza. Dan ta' l-aħħar għandu jkun ikkonsidrat fuq il-bażi ta' każ b'każ, bil-ġustifikazzjoni tkun ipprovduta fir-rapport.

Ir-riżultati mis-sistemi tal-qbid tal-gassijiet/volatili (CO_2 u oħrajn, i.e. komposti organiċi volatili) għandhom ikunu rrapurtati f'kull waqt tal-kampjunat. Ir-rati tal-mineralizzazzjoni għandhom ikunu rrapurtati. Residwi mhux estrattibbli (marbuta) fis-sediment għandhom ikunu irrapurtati f'kull punt tal-kampjunar.

[1] F'każijiet fein ir-*re-oxidation* mgħaġġla tal-prodotti tat-trasformazzjoni anajrobika tista' sseħħ, il-kondizzjonijiet anajrobiċi għandhom jinżammu waqt l-ikkampjunar u l-analiżi.

▼B

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Il-bilanċ jew l-irkupru tal-massa totali (ara s-sezzjoni 1.7.1) tar-radjoattività miżjuda għandhom ikunu ikkalkolati f'kull waqt tal-kampjunar. Ir-riżultati għandhom ikunu irrapurtati bħala persentaġġ tar-radjoattività miżjuda. Id-distribuzzjoni tar-radjoattività bejn l-ilma u s-sediment għanda tkun irrapurtata bħala konċentrazzjonijiet u persentaġġi, f'kull waqt tal-kampjunar.

In-nofs-ħajja, il-DT_{50} u, jekk xieraq, il-DT_{75} u il-DT_{90} tas-sustanza tat-test għandhom ikunu ikkalkolati flimkien mal-limiti ta' affidibbilità tagħhom (ara s-sezzjoni 1.7.3). L-informazzjoni dwar ir-rata tad-dissipazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma u fis-sediment tista tkun akkwistata mill-użu ta' l-għodda xierqa ta' l-evalwazzjoni. Dawn jistgħu ivarjaw mill-applikazzjoni tal-kinetiċi ta' psewdo-l-ewwel-ordni, tat-teknika li timxi mal-kurva emprika li tapplika għal soluzzjonijiet grafiċi jew numeriċi u l-assaġġ aktar kumpless bl-użu, per eżempju, tal-mudelli ta' kompartiment singolu jew multiplu. N Aktar dettalji jistgħu ikunu akkwistati mill-letteratura relevanti kif ippubblikata (35) (36) (37).

Ir-resqien kollu għandu s-saħħa u d-debbolizzi tiegħu u jvarja konsiderevolment fil-komplessità, Preżunzjoni tal-kinetiċi ta' l-ewwel ordni tista ssir b'simplifikazzjoni żejda tal-proċessi tad-degradazzjoni u tad-distribuzzjoni, imma meta possibbli li tagħti terminu (ir-rata kostanti jew nofs-ħajja) li faċilment ikunu jifthiemu u l-valur fil-mudellar tas-simulazzjoni u l-kalkolu tal-konċentrazzjonijiet ambjentali previsti. Resqien empiriku jew trasformazzjonijiet lineari jistgħu jirriżultaw fi dħul aħjar tal-kurvi mad-dettall u għalhekk jippermettu estimi aħjar tan-nofs-ħajja, DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90}. L-użu tal-kostanti derivati, b'dana kollu huwa limitat. Mudelli kumpartimentali jistgħu jiġġeneraw numru ta' kostanti utili ta' valur fir-riskju ta' l-assaġġ li jiddeskrivi r-rata tad-degradazzjoni f'kumpartimenti differenti u d-distribuzzjoni tal-kimika. Dawn għandhom ukoll ikunu wżati għall-estimi tal-kostanti tar-rata għall-formazzjoni u d-degradazzjoni ta' prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni. Fil-każi kollha, il-metodu wżat għandu jkun ġustifikat u min jagħmel l-esperiment għandu juri b'mod grafiku u/jew l-istatistika ta' dħul aħjar.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— l-isem komuni, l-isem kimiku, in-numru CAS, il-formula strutturali (bl-indikazzjoni tal-posizzjoni tat-tikketti meta materjal radjo-tikkettjat ikun użat) u l-propjetajiet fiżiċi-kemikali relevanti;

— il-purità (l-impuritajiet) tas-sustanza tat-test;

— il-purità tar-radjokimika tal-kimika tikkettjata u l-attività speċifika (meta xieraq);

▼B

Sustanzi ta' referenza:

— l-isem kimiku u l-istruttura tas-sustanzi ta' referenza kif użati għall- karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodott tat-trasformazzjoni;

Sedimenti u ilmijiet tat-test:

— il-lokalità u d-deskrizzjoni tas-sit(i) tal-kampjunar tas-sediment akwatiku, inkluża, jekk possibbli, l-istorja tal-kontaminazzjoni;

— l-informazzjoni kollha li tirrigwardja il-ġbir, il-ħażna (jekk ikun hemm) u l-akklamizzazzjoni tas-sistemi ta' l-ilma/sediment;

— karatteristiċi tal-kampjunar ilma-sediment kif elenkati fit-Tabella fis-sezzjoni 1.8.2.2.

Kondizzjonijiet tat-test:

— is-sistema tat-test użata (eż. in-nixxija kontinwa, il-biometrika, il-mezz tal- ventilazzjoni, il-metodu tat-taħwid, il-volum ta' l-ilma, il-massa tas-sediment, il-ħxuna kemm tas-saff ta' l-ilma u tas-sediment, il-qisiem tar-reċipjenti tat-test, eċċ.);

— l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test għas-sistema tat-test: Il-konċentrazzjoni tat-test kif użata, in-numri ta' repliki u l-modula tal-kontrolli ta' l-applikazzjoni tas-sustanzaa tat-test (eż. l-użu tas-solvent jekk ikun hemm), eċċ.;

— temperatura ta' l-inkubazzjoni;

— id-drabi tal-kampjuna;

— il-metodi ta' l-estrazzjoni u l-effiċċjenzi kif ukoll il-metodi analitiċi u l-limiti tas-sejbien;

— il-metodi għall-karatterizzazzjoni/identifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni;

— devjazzjonijiet mill-protokoll tat-test jew mill-kondizzjonijiet tat-test, matul l-istudju.

Riżultati:

— dettalji fi stat oriġinali tal-figuri li jirrapreżentaw analiżi (id-dettalj kollha fi stat oriġinali għandhom ikunu maħżuna fl-arkivji-GLP);

— ir-repettabbilità u s-sensittività tal-metodi analitiċi użati;

— ir-rati ta' l-irkupru (% valuri għal studju validu huma mogħtija fis-sezzjoni 1.7.1);

— tabelli tar-riżultati espressi bħala % tad-doza applikata u fi mg.kg-1 fl-ilma, sediment u s-sistema totali (% biss) għas-sustanza tat-test u, jekk xieraq, għall-prodotti tat-trasformazzjoni u tar-radjoattività mhux-estrattibbli;

— il-bilanċ tal-massa, matul u qrib it-tmiem ta' l-istudji;

— rapreżentazzjoni grafika tat-trasformazzjoni fl-ilma u l-frazzjonijiet tas- sediment u fis-sistema totali (inkluża l-mineralizzazzjoni);

— rati tal-mineralizzazzjoni;

▼B

— in-nofs-ħajja, il- DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90} tas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-proddotti tat-trasfirmazzjoni maġġuri inklużi fil-limiti ta' l-affidabbilità fl-ilma, fis-sediment u fis-sistema totali;

— kalkolu tal-kinetiċi tat-trasformazzjoni għas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni;

— il-passaġġi proponuti tat-trasformazzjoni, meta xieraq;

— diskussjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) Linja ta' Gwida BBA għall-eżaminazzjoni tal-protetturi tal-pjanti fil-progress tar-reġistrazzjoni. (1990). Parti IV, Sezzjoni 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Il-Ġermanja.

(2) Kummissjoni għar-reġistrazzjoni tal-pestiċidi: L-Applikazzjoni għar-reġistrazzjoni tal-pestiċidi. (1991). Part G. Imġieba tal-prodott u l-metabiżmi tiegħu fil-ħamrija, fl-ilma u fl-arja, Sezzjoni G.2.1 (a). L-Olanda.

(3) MAFF Direttorat dwar is-Sigurtà tal-Pestiċidi. (1992). Linja ta' Gwida prelimari għall-imġieba tat-testijiet dwar il-biodegrabbilità tal-pestiċidi f'sistemi naturali ta' sedimen-t/ilma. Ref No SC 9046. Renju Unit.

(4) Agrikoltura Kanada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anae-robic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038- 1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop "A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigationextraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of 14C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

ANNESS 1

LINJA TA' GWIDA DWAR IS-SISTEMI TAS-TEST EROBIKU U ANEROBIKU

Sistema ta' test erobiku

Is-sistema tat-test erobiku deskritta f'dan il-metodu tat-test tikkonsisti minn saff ilma erobiku (konċentrazzjoni tipika ta' l-ossiġenu fil-medda bejn 7 u 10 $mg \cdot l^{-1}$) u saff tas-sediment, erobiku fil-wiċċ u anerobiku taħt il-wiċċ (medja tipika tal-potenzali redox (Eh) fiż-żona anerobika tas-sediment fil-medda minn –80 sa –190 mV). L-arja umida tkun mogħddiha matul il-wiċċ ta' l-ilma ta' kull unità ta' l-inkubazzjoni sabiex iżżomm ossiġenu suffiċjenti fl-ispazju ta' fuq.

Sistema ta' test anerobiku

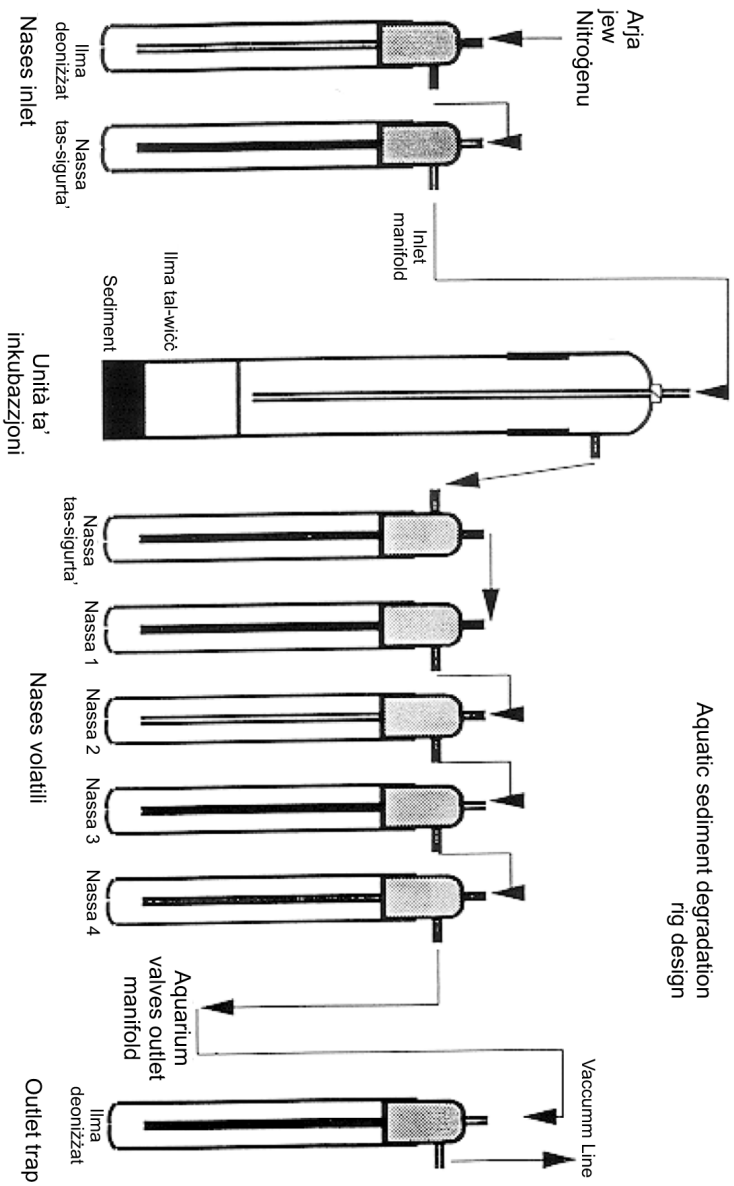
Għas-sistema tat-test anerobiku, il-proċedura tat-test hija essenzalment l-istess bħal dik elenkata għas-sistema erobika bl-eċċezzjoni li nitroġenu umidu jkun mogħddi minn fuq il-wiċċ ta' l-ilma f'kull unità ta' l-inkubazzjoni sabiex jinżamm spaziu fil-wiċċ bin-nitroġenu. Is-sediment u l-ilma huma meqjusa bħala anerobiċi la darba l-potenzal tar-redox (E_h) ikun aktar baxx minn –100 mV.

Fit-test anerobiku, l-assaġġ tal-mineralizzazzjoni jinkludi l-kejl tad-diossidu tal-karbonu u tal-metanju evoluti.

▼B

ANNESS 2

EŻEMPJU TA' L-APPARAT TAN-NIXXIJA KONTINWA TAL-GASS

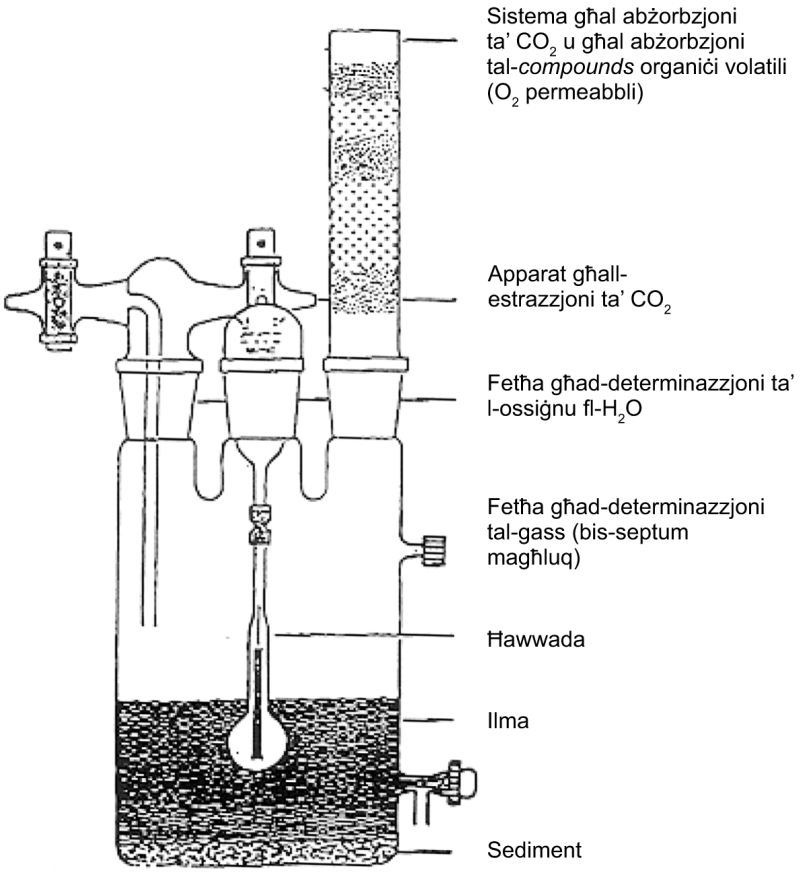


Nassa tas-sigurta', vojta
Nassa 1:
ethyleneglycol biex jinqabdu l-volatili organiċi
Nassa 2:
Aċdu solforiku 0.1 M biex jinqabdu l-volatili alkalini
Nassa 3 & 4:
Sodju hydroxide 2M biex jinqabad CO_2 u volatili aċidi oħra

▼B

ANNESS 3

EŻEMPJU TA' L-APPARAT BIOMETRIKU



Ħawwada manjetika

▼B

ANNESS 4

EŻEMPJU TAL-KALKOLU GĦALL-APPLIKAZZJONI TA' DOŻA MAR-REĊIPJENTI TAT-TEST

Diametru intern taċ-ċildru:	= 8 cm
Fond tal-kolonna ta' l-ilma li ma jinkludix is-sediment:	= 12 cm
Iż-żona tal-wiċċ 3,142 × 4^2	= 50,3 cm^2
Rata ta' l-applikazzjoni: 500 g sustanza tat-test/ ha tikkorrespondi għal 5 µg/cm^2	
Total µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
Aġġusta l-kantità b'relazzjoni mal-fond ta' 100 cm: 12 × 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Kolonna tal-volum ta' l-ilma: 50,3 × 12	= 603 ml
Konċentrazzjoni fl-ilma 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml jew 50 µg/l

▼M1

C.25. MINERALIZZAZZJONI LI TEĦTIEĠ L-OSSIĠNU FL-ILMA TAL-WIĊĊ — TEST TAS-SIMULAZZJONI TAL-BIJODEGRADAZZJONI

1. METODU

Dan il-metodu hu ekwivalenti għall-*OECD* TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop ta' dan it-test hu li jkejjel iż-żmien meħtieġ għall-bijodegradazzjoni ta' sustanza użata għat-test b'konċentrazzjoni baxxa fl-ilma naturali li jkun jeħtieġ l-ossiġnu u biex jikkwantifika l-osservazzjonijiet f'forma ta' espressjonijiet tar-rata tal-moviment. Dan it-test simulatorju huwa test li jsir fil-laboratorju billi jiġi mħawwad ażżett ħalli jkunu magħrufa r-rati ta' bijodegradazzjoni li teħtieġ l-ossiġnu ta' sustanzi organiċi f'kampjuni ta' ilma naturali tal-wiċċ (frisk, ftit mielaħ jew ilma baħar). Hu bbażat fuq l-ISO/DIS 14592-1 (2) u jinkludi wkoll elementi mill-metodi tat-test Ċ.23 u Ċ.24 (3)(4). Hemm l-għażla li, b'ħinijiet twal tat-test, operazzjoni semi-kontinwa tieħu post l-operazzjoni fuq grupp sabiex tipprevjeni d-deterjorament tal-mikrokosmu taħt test. L-għan prinċipali tat-test simulatorju hu biex tkun magħrufa l-mineralizzazzjoni tas-sustanza użata għat-test fl-ilma tal-wiċċ, u l-mineralizzazzjoni hi l-bażi ta' kif tiġi espressa d-dižintegrazzjoni tal-movimenti. Madankollu, it-test jista' jkollu għan ieħor sekondarju biex tinkiseb informazzjoni dwar id-dižintegrazzjoni ewlenija u l-formazzjoni ta' prodotti maġġuri ta' trasformazzjoni. L-identifikazzjoni ta' prodotti ta' trasformazzjoni, u fejn hu possibbli l-kwantifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tagħhom, huma tassew importanti għal sustanzi li jiġu mineralizzati bil-mod ħafna (eż. fil-każ ta' nofs ħajjiet għas-sustanzi totali li jifdal wara l-evaporazzjoni ^{14}C li jaqbżu is-60 ġurnata). Konċentrazzjonijiet ogħla tas-sustanza użata għat-test (eż., > 100 µg/l) għandhom jintużaw normalment biex ikunu identifikati u kwantifikati prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri minħabba limitazzjonijiet analitiċi.

Konċentrazzjoni baxxa f'dan it-test tfisser konċentrazzjoni (eż. inqas minn 1 µg/l sa 100 µg/l) li hi baxxa biżżejjed biex tiżgura li l-movimenti tal-bijodegradazzjoni miksuba fit-test jirriflettu dawk li wieħed jistenna li jkun hemm fl-ambjent. Meta mqabbla mal-piż totali tas-sottostrati tal-karbonju bijodegradabbli li hemm fl-ilma naturali użat għat-test, is-sustanza użata għat-test b'konċentrazzjoni baxxa se sservi bħala sottostrata oħra. Dan jimplika li l-movimenti tal-bijodegradazzjoni antiċipati huma tal-ewwel ordni (movimenti "li ma jikbrux") u li s-sustanza użata għat-test tista' tiġi ddegradata permezz ta' "kometaboliżmu". Movimenti tal-ewwel ordni jimplikaw li r-rata tad-dižintegrazzjoni (mg/L/kull ġurnata) hija proporzjonali mal-konċentrazzjoni tas-sottostrata li tonqos maż-żmien. Fil-każ tal-movimenti tal-ewwel ordni r-rata kostanti tad-dižintegrazzjoni speċifika, k, ma tiddependix fuq iż-żmien u l-konċentrazzjoni. Dan ifisser li, k ma tvarjax ħafna matul l-esperiment u lanqas tinbidel bil-konċentrazzjoni miżjuda waqt l-esperimenti. Skont id-definizzjoni, il-kostanti tar-rata tad-dižintegrazzjoni speċifika hija ugwali għall-bidla relattiva fil-konċentrazzjoni biż-żmien: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Għalkemm wieħed jistenna li l-movimenti tal-ewwel ordni jkunu normalment taħt il-kundizzjonijiet preskritti, jista' jkun hemm ċerti ċirkustanzi fejn movimenti oħra huma aktar addattati. Id-devjazzjonijiet mill-movimenti tal-ewwel ordni jistgħu eż. jiġu osservati jekk il-fenomeni tat-trasferiment tal-piż bħar-rata tat-tifrix, aktar milli r-rata tar-reazzjoni bijoloġika, tkun qed tillimita r-rata tal-bijotrasformazzjoni. Madankollu, id-data tista' kważi dejjem tkun deskritta minn movimenti tal-ewwel ordni li jixxiebhu li jaċċettaw kostanti tar-rata ta' konċentrazzjoni dipendenti.

▼**M1**

Informazzjoni dwar il-bijodegradabbiltà tas-sustanza użata għat-test f'konċentrazzjonijiet ogħla (eż. mit-testijiet standard ta' *screening*) kif ukoll informazzjoni dwar id-degradabbiltà li mhix ta' natura bijoloġika, prodotti ta' trasformazzjoni u karatteristiċi fiżiko-kemikali relevanti għandhom ikunu disponibbli qabel it-test biex ikun jista' jiġi stabbilit l-ippjanar esperimentali u jiġu interpretati r-riżultati. L-użu ta' sustanzi għat-test imsemmija ^{14}C u l-għarfien tal-faži tat-tqassim ta' ^{14}C fl-aħħar tat-test, għandhom jgħinu biex tkun magħrufa l-bijodegradabbiltà finali. Meta tkun użata sustanza għat-test li ma ngħatatx isem, il-bijodegradazzjoni finali tista' tkun stmata biss jekk tiġi ttestjata konċentrazzjoni ogħla u l-prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri kollha jkunu magħrufa.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Bijodegradazzjoni primarja: Il-bidla strutturali (trasformazzjoni) ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi li twassal biex tintilef l-identità kimika.

Bijodegradazzjoni funzjonali: Il-bidla strutturali (trasformazzjoni) ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi li twassal biex tintilef karatteristika speċifika.

Bijodegradazzjoni li tkun teħtieġ l-ossiġnu finali: Id-diżintegrazzjoni ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi meta jkun hemm l-ossiġnu mal-karbonju diossidu, l-ilma u l-melħ minerali u xi elementi oħra (mineralizzazzjoni) preżenti u l-ħolqien tal-piż totali ta' l-organiżmi u prodotti organiċi li fihom bijosinteżi tal-mikroorganiżmi ġodda.

Mineralizzazzjoni: Id-diżintegrazzjoni ta' sustanza kimika f'materja organika minħabba l-mikroorganiżmi li hemm fl-ossiġnu mal-karbonju diossidu, l-ilma u l-melħ minerali ta' xi elementi oħra preżenti.

Faži tad-dewmien: Il-ħin minn meta jibda test sakemm jintlaħaq l-addattament tad-degradar tal-mikro organiżmi u l-ammont ta' bijodegradazzjoni ta' sustanza kimika jew materja organika żdied għal livell li jista' jkun magħruf (eż. 10 % tal-bijodegradazzjoni teoretika massima, jew inqas, jiddependi minn kemm hi preċiża t-teknika tal-kejl).

Livell massimu ta' bijodegradazzjoni: L-ammont ta' bijodegradazzjoni ta' sustanza kimika jew materja organika f'test, irrekordjata f'perċentwal, li 'l fuq minnu ma ssirx aktar bijodegradazzjoni waqt it-test.

Sottostrata primarja: Ġabra ta' karbonju naturali u sorsi ta' enerġija li jkabbru u jżommu l-piż totali tal-organiżmi mikrobjali.

Sottostrata sekondarja: Komponent tas-sottostrata li hemm f'dik il-konċentrazzjoni baxxa, li bid-diżintegrazzjoni tiegħu, ammonti żgħar ħafna ta' karbonju u enerġija jiġu mgħoddija lill-mikroorganiżmi kompetenti, meta mqabbla mal-karbonju u l-enerġija mogħtija mid-diżintegrazzjoni tal-komponenti tas-sottostrata ewlenija (sottostrati primarji).

Ir-rata tad-diżintegrazzjoni kostanti: Rata tal-moviment kostanti tal-ewwel ordni jew li tixbaħha, k (d^{-1}), li tindika r-rata tal-proċessi tad-diżintegrazzjoni. Għal esperiment fuq grupp k hi stmata mill-parti tal-bidu tal-kurva tad-diżintegrazzjoni miksuba wara li tintemm il-faži tad-dewmien.

Nofs ħajja, $t_{1/2}$ (d): Terminu użat biex jikkaratterizza r-rata tar-reazzjoni tal-ewwel ordni. Hu l-intervall tal-ħin li jikkorrispondi għal tnaqqis fil-konċentrazzjoni b'fattur 2. In-nofs ħajja u l-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni huma marbuta ma' l-ekwazzjoni $t_{1/2} = \ln 2/k$.

▼M1

Il-brejk tad-diżintegrazzjoni, DT_{50} (d): Terminu użat biex jikkwantifika r-riżultat tat-testijiet tal-bijodegradazzjoni. Huwa l-intervall ta' ħin, inkluż il-fażi tad-dewmien, meħtieġ biex jintlaħaq valur ta' 50 % bijodegradazzjoni.

Il-limitu tal-għarfien (*LOD*) u l-limitu tal-kwantifikazzjoni (*LOQ*): Il-limitu tal-għarfien (*LOD*) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza li 'l isfel minnu l-identità tas-sustanza ma tkunx tista' tintgħaraf mill-karatteristiċi li ddaħħlu fil-preparazzjoni għall-analiżi. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza li 'l isfel minnu l-konċentrazzjoni ma tistax tkun magħrufa bi preċiżjoni aċċettabbli.

Karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*): Dik il-parti tal-karbonju organiku f'kampjun ta' ilma li ma tistax titneħħa b'fażi ta' separazzjoni speċifika, per eżempju b'azzjoni ċentrifuga permezz ta' magna f'40 000 ms^{-2} għal 15-il min jew bl-iffiltrar tal-membrana billi jintużaw membrani li fihom pori b'dijametru ta' 0,2 μm-0,45 μm.

L-attività organika ^{14}C totali (*TOA*): L-attività totali ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku.

L-attività organika ^{14}C maħlula fl-ilma (*DOA*): L-attività totali organika ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku maħlul fl-ilma.

L-attività organika ^{14}C f'forma ta' *partikuli* separati (*POA*): L-attività totali ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku f'forma ta' *partikuli* separati.

1.3. APPLIKABILITÀ TAT-TEST

Dan it-test simulatorju japplika għal sustanzi organiċi li ma jevaporawx malajr jew jevaporaw xi ftit malajr ittestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. Permezz ta' fliexken miftuħa għall-arja (eż. tajjar imdeffes), sustanzi bil-kostanti tar-regola ta' *Henry* inqas minn madwar 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (madwar 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) jistgħu jitqiesu li ma jevaporawx malajr fil-prattika. Permezz ta' fliexken magħluqa bl-ispazju fuq, hu possibbli li jiġu ttestjati sustanzi li ma tantx jevaporaw malajr (bil-kostanti tar-regola ta' *Henry* < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ jew < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) mingħajr telf fis-sistema tat-test. Jista' jkun hemm telf tas-sustanzi msejħa ^{14}C, jekk ma jittieħdux il-prekawzjonijiet ġusti, meta jitneħħa s-CO_2. F'dawk is-sitwazzjonijiet, jista' jkun hemm bżonn li s-CO_2 jinqabad ġo assorbitur intern bl-*alkali* jew li tintuża sistema esterna li tassorbi s-CO_2 (għarfien dirett tal-$^{14}CO_2$; ara Anness 3). Biex ikunu magħrufa l-movimenti tal-bijodegradazzjoni, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza użata għat-test iridu jkunu taħt meta tinħall fl-ilma. Ta' min jinnota, iżda, li l-valuri tal-letteratura ta' meta jinħall fl-ilma jistgħu jkunu ogħla sew minn meta tinħall is-sustanza użata għat-test fl-ilmijiet naturali. Hemm l-għażla li tiġi stabbilita s-solubilità ta' sustanzi tat-test partikolari li ma tantx jinħallu fl-ilma permezz tal-ilmijiet naturali li jkunu qed jiġu ttestjati.

Il-metodu jista' jkun użat biex tiġi simulata l-bijodegradazzjoni fl-ilma tal-wiċċ li ma jkunx fih partikuli ħorox ("test li jsir fil-baħar miftuħ") jew fil-wiċċ tal-ilma mhux ċar, eż. li jista' jkun hemm ħdejn post fejn l-ilma jiltaqa' man-naqal ("test sospiż tan-naqal").

▼M1

1.4. IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

It-test isir fi grupp billi s-sustanza użata għat-test tiġi żviluppata fiha l-batteri jew mill-ilma tal-wiċċ biss (“test li jsir fil-baħar miftuħ”) jew ilma miżjud b'solidi/naqal miżmuma x’imkien bejn il-qiegħ u fuq ta' 0,01 sa lg/L użin xott (“test sospiż” tan-naqal biex ikun jixbah *body* tal-ilma miżmuma x’imkien bejn il-qiegħ u fuq jew naqal li jerġa’ jkun sospiż bejn il-qiegħ u fuq. Is-solidi miżmuma x’imkien bejn il-qiegħ u fuq/il-konċentrazzjoni tan-naqal fil-firxa t'isfel ta' dan l-intervall hi tipika għal ħafna ilmijiet fil-wiċċ. Il-fliexken tat-test tiżviluppata fihom batteri fid-dlam f’temperatura ambjentali taħt kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu u l-aġitazzjoni. Tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test għandhom jintużaw sabiex jiġu ddeterminati l-movimenti tad-dižintegrazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet għandhom ivarjaw minn xulxin b’fattur ta’ 5 sa 10 u għandhom jirrappreżentaw il-firxa mistennija ta’ konċentrazzjonijiet fl-ambjent. Il-konċentrazzjoni massima tas-sustanza tat-test m’għandhiex teċċedi 100 µg/L, iżda l-konċentrazzjonijiet massimi tat-test taħt 10 µg/L jew inqas huma preferuti biex ikun żgurat li l-bijodegradazzjoni ssegwi l-movimenti tal-ewwel ordni. L-ibaxx konċentrazzjoni m’għandhiex teċċedi 10 µg/L, iżda l-ibaxx konċentrazzjonijiet tat-test ta’ 1-2 µg/L jew inqas minn 1 µg/L huma preferuti. Normalment analiżi adegwata ta’ dik il-konċentrazzjoni baxxa tista’ tintlaħaq bl-użu ta’ sustanzi msejħa ^{14}C li ssib tixtrihom. Minħabba l-limitazzjonijiet analitiċi, ta’ spiss ikun impossibbli li titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test bil-preċiżjoni meħtieġa, jekk is-sustanza tat-test hi applikata f’konċentrazzjoni ta’≤ 100 µg/L (ara t-tieni paragrafu f’sezzjoni 1.7.2.). Konċentrazzjonijiet ogħla ta’ sustanzi użati għat-test (> 100 µg/L u xi kultant > 1 mg/L) jistgħu jintużaw għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni ta’ prodotti ta’ trasformazzjoni maġġuri jew jekk m'hemmx metodu ta’ analiżi speċifiku b’limitu baxx li jidditektja. Jekk ikunu ttestjati konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, jista’ ma jkunx possibbli li r-riżultati jintużaw biex tkun stmata l-kostanti tad-dižintegrazzjoni tal-ewwel ordni u n-nofs ħajja, għax id-dižintegrazzjoni probabbilment ma ssegwix il-movimenti tal-ewwel ordni.

Id-dižintegrazzjoni tkun segwita f’intervalli tal-ħin addattati, billi titkejjel jew is-sustanza li jkun fadal wara l-evaporazzjoni ^{14}C jew il-konċentrazzjoni li jkun fadal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test meta tintuża analiżi kimika speċifika. L-għoti tal-isem ^{14}C tal-aktar parti stabbli tal-molekula jiżgura li tkun determinata l-mineralizzazzjoni totali, filwaqt li l-għoti ta' l-isem ^{14}C ta’ parti inqas stabbli tal-molekula, kif ukoll l-użu ta’ analiżi speċifika, jagħti lok għal evalwazzjoni tal-bijodegradazzjoni primarja biss. Madankollu, l-aktar parti stabbli mhux neċessarjament tinkludi n-nofs funzjonali relevanti tal-molekula (li tista' tkun relatata ma' karatteristika speċifika bħat-tossiċità, il-bijoakkumulazzjoni, eċċ.) Jekk hekk ikun il-każ, ikun xieraq li tintuża sustanza tat-test, imsemmija ^{14}C, fil-parti funzjonali sabiex issegwi t-tneħħija tal-karatteristika speċifika.

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Kemm is-sustanzi tat-test li ġew immarkati permezz ta' raġġi (*radiolabelled*)kif ukoll dawk li ma ġewx mogħtija isem jistgħu jintużaw f'dan it-test. It-teknika tal-għoti tal-isem ^{14}C hi rakkomandata u l-għoti tal-isem għandu jsir normalment fl-aktar parti(jiet) stabbli tal-molekula (ara anki sezzjoni 1.4.). Għal sustanzi li fihom aktar minn ċirku li mhux saturizzat bl-umdità, karbonju wieħed jew aktar f’kull ċirku għandu preferebbilment ikun mogħti l-isem ^{14}C. Barra minn hekk, karbonju wieħed jew aktar fuq iż-żewġ naħat ta’ għaqdiet li jistgħu jiġu dižintegrati faċilment għandhom preferibbilment ikollhom l-isem ^{14}C. Il-purità kimika u/jew radjokimika tas-sustanza tat-test għandha tkun > 95 %. Għal sustanzi mmarkati permezz ta’ raġġi, attività speċifika ta’ madwar 50 µCi/mg (1,85 MBq) jew aktar hi preferuta sabiex tiffaċilita l-kejl ^{14}C f’testijiet li jsiru b’konċentrazzjonijiet baxxi fil-bidu. Għandu jkun hemm l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza użata għat-test:

▼**M1**

— is-solubilità fl-ilma [Metodu A6];

— is-solubilità f'aġent(i) organiku li jinħall (sustanzi applikati bl-aġent li jinħall jew li ma tantx jinħallu fl-ilma);

— il-kostanti dikompost (pKa) jekk is-sustanza għandha tendenza għal *protonation* jew *deprotonation* [*OECD TG* 112] (5);

— il-pressjoni tal-fwar [Metodu A.4] u l-liġi ta' *Henry* kostanti;

— stabbilità kimika fl-ilma u fid-dlam (idrolisi) [Metodu C.7].

Meta sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma jkunu qed jiġu ttestjati fl-ilma baħar, ta' min ikun jaf il-kostanti tat-tneħħija tal-melħ (jew "il-kostanti *Setschenow*") K^s, li huma mfissra permezz tal-espressjoni: log (S/S') = K^s C_m, fejn S u S' huma kemm tinħall is-sustanza fl-ilma pur u l-ilma baħar, rispettivament, u C_m hija l-konċentrazzjoni *molar* tal-melħ.

Jekk it-test isir bħala "test tan-naqal miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u fuq" l-informazzjoni li ġejja għandha tkun disponibbli:

— koeffiċjent tad-diviżjoni *n-octanol*/ilma [Metodu A.8];

— koeffiċjent ta' kemm il-molekuli jżommu fil-wiċċ ta' likwidu (*absorption coefficient*) [Metodu C.18];

Informazzjoni oħra utli tista' tinkludi:

— il-konċentrazzjoni ambjentali, jekk tkun magħrufa jew stmata;

— it-tossiċità tas-sustanza użata għat-test għall-mikroorganiżmi [Metodu C.11];

— bijodegraddibiltà lesta u/jew li teżisti fiha [Metodi C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)];

— studji dwar il-bijodegradabbiltà li teħtieġ l-ossiġnu fl-ilma jew li ma teħtieġx ossiġnu fil-ħamrija u fil-bidla tan-naqal/l-ilma [Metodi C.23, C.24].

1.6. SUSTANZA UŻATA BĦALA REFERENZA

Sustanza, li tista' tiddiżintegra faċilment f'kundizzjonijiet li jkunu jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma (eż. l-*aniline* jew *is-sodium benzoate*) għandha tintuża bħala sustanza ta' referenza. L-intervall ta' ħin mistenni għad-diżintegrazzjoni tal-*aniline* u tas-*sodium benzoate* huwa normalment inqas minn ġimagħtejn. L-iskop tas-sustanzi użati bħala referenza hu li jkun żgurat li l-attività tal-mikroorganiżmi ta' l-ilma użat għat-test hi f'ċerti limiti; jiġifieri li l-ilma fih popolazzjoni attiva ta' mikroorganiżmi.

▼M1

1.7. KRITERJI DWAR IL-KWALITA'

1.7.1. **Irkuprar**

Hekk kif tiġi miżjuda s-sustanza użata għat-test, kull test tal-konċentrazzjoni tal-bidu għandu jiġi vverifikat billi titkejjel l-attività ^{14}C, jew permezz ta' analiżi kimika fil-każ ta' sustanzi li m'għandhomx isem, f'tal-inqas kampjuni doppji. Dan jagħti informazzjoni dwar kemm għandu jkun applikat u kemm għandu jiġi mtenni l-metodu analitiku kif ukoll dwar kemm hu uniformi t-tqassim tas-sustanza użata għat-test. Normalment, l-attività ^{14}C inizjali jew il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jintużaw fl-analiżi sussegwenti tad-data aktar milli l-konċentrazzjoni nominali bħala telf minħabba s-*sorption* u żbalji fid-daqs tad-doži jiġu kumpensati. Għas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C, il-livell ta' irkuprar fl-aħħar tal-esperiment hu mogħti bil-bilanċ fil-piż (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.4). Idealment, il-bilanċ tal-piż immarkat permezz ta' raġġi għandu jestendi minn 90 % għal 110 %, filwaqt li l-preċiżjoni analitika għandha twassal għal irkuprar tal-bidu bejn 70 % u 110 % għal sustanzi tat-test li m'għandhomx isem. Dawn il-firxiet għandhom ikunu interpretati bħala miri u m'għandhomx jintużaw bħala kriterji biex jiġi aċċettat it-test. Il-preċiżjoni analitika tista' tiġi ddeterminata ukoll għas-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni ibaxx mill-konċentrazzjoni tal-bidu u għall-prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri.

1.7.2. **Kemm għandu jiġi mtenni u kemm hu sensittiv il-metodu analitiku**

Kemm għandu jiġi mtenni l-metodu analitiku (inkluż l-effiċjenza tal-estrazzjoni tal-bidu) biex tiġi kwantifikata s-sustanza tat-test, u l-prodotti ta' trasformazzjoni, jekk jixraq, għandu jkun iċċekkjat billi jkun hemm ħames analiżi l-istess tal-estratti individwali tal-ilma tal-wiċċ.

Il-limitu ta' għarfien (*LOD*) tal-metodu analitiku għas-sustanza użata għat-test u għall-prodotti ta' trasformazzjoni għandu jkun tal-inqas 1 % tal-ammont tal-bidu applikat lis-sistema tat-test jekk hu possibbli. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (*LOQ*) għandu jkun daqs jew inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni applikata. L-analiżi kimika ta' ħafna sustanzi organiċi u l-prodotti tat-trasformazzjoni tagħhom ta' spiss jeħtieġu li s-sustanza użata għat-test tkun applikata f'konċentrazzjoni kemm xejn għolja, jiġifieri > 100 μg/L.

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.8.1. **Tagħmir**

It-test jista' jsir fi fliexken forma ta' lembut jew forma ta' ċilindru tad-daqs addattat (eż. li jesgħu 0,5 jew 1,0 litru) magħluqa b'tappijiet tas-silikon jew lastku, jew fi fliexken tas-*serum* b'għotjien li ma joħroġx minnhom CO_2 (eż. b'għeluq tal-lastku sintetiku). Inkella t-test jista' jsir bl-użu ta' ħafna fliexken u bl-osservazzjoni tal-konsegwenzi tal-fliexken kollha, ta' l-inqas darbtejn, f'kull intervall tal-kampjuni (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1). Għas-sustanzi tat-test li ma jevaporawx malajr u li mhumiex immarkati bir-raġġi, m'hemmx bżonn ta' tappijiet jew għotjien li ma joħroġx gass minnhom; biċċiet tat-tajjar li ma jagħtux lok li jkun hemm kontaminazzjoni mill-arja huma addattati (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1.). Sustanzi li ma tantx jevaporaw malajr għandhom ikunu ttestjati f'sistema tat-tip tal-*bijometer* billi jitħawwad bil-mod l-ilma tal-wiċċ. Biex ikun żgurat li ma ssirx kontaminazzjoni mill-batterji, il-kontenituri jistgħu jiġu sterilizzati billi jissaħħnu jew jiġu stimjati qabel ma jintużaw. Barra minn hekk, it-tagħmir standard tal-laboratorju li ġej huwa użat:

— mejda li tittriegħed jew oġġetti li jħalltu manjetiċi biex ikun hemm ċaqliq kontinwu tal-fliexken użati għat-test,

▼M1

— magna ċentrifuga,

— pH meter,

— *turbidimeter* biex ikejjel konċentrazzjoni tal-frak tat-tajn,

— forn jew majkrowejv biex ikun magħruf il-piż xott,

— apparat li jissepara l-membrana,

— sterilizzatur li juża' stim bi pressjoni għolja jew forn biex jisterilizza bis-sħana l-kontenituri tal-ħġieġ,

— faċilitijiet biex jimmaniġġjaw is-sustanzi mmarkati ^{14}C,

— tagħmir biex tiġi kwantifikata l-attività ^{14}C f'kampjuni mit-taħlitiet li jaqbdu s-CO_2 u, jekk hemm bżonn, mill-kampjuni tan-naqal,

— tagħmir analitiku biex tkun magħrufa s-sustanza użata għat-test (jew is-sustanza ta' referenza) jekk tintuża' analiżi kimika speċifika (eż. dak li jifred il-gass f'taħlita, dak li jifred il-likwidu bi pressjoni għolja).

1.8.2. **Taħlitiet tal-kwantità tas-sustanza tat-test**

Ilma mingħajr *ions* użat biex jiġu ppreparati t-taħlitiet tal-kwantità tat-test u s-sustanzi ta' referenza (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.7). L-ilma mingħajr *ions* m'għandux ikun fih sustanzi li jistgħu jkunu tossiċi għall-mikroorganiżmi, u l-karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*) m'għandux ikun aktar minn 1 mg/L (6).

1.8.3. **Ġbir u ġarr tal-ilma tal-wiċċ**

Il-post fejn jittieħdu l-kampjuni għall-ġbir tal-ilma tal-wiċċ għandu jintgħażel skont l-għan tat-test f'kull sitwazzjoni partikolari. Meta jintgħażlu l-postijiet fejn għandhom jittieħdu l-kampjuni, għandha titqies l-istorja ta' kontribut agrikolu, industrijali jew domestiku li jista' jkun hemm. Jekk ikun magħruf li ambjent akwatiku ġie kkontaminat bis-sustanza tat-test jew l-analogu struttuturali tagħha fl-erba' snin ta' qabel, m'għandux jintuża' għall-ġbir ta' ilma għat-test, sakemm l-investigazzjoni tar-rati ta' diżintegrazzjoni f'postijiet li kienu esposti qabel huwa l-għan dikjatur ta' l-investigatur. Il-*pH* u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu mkejla fil-post tal-ġbir. Barra minn hekk, il-fond tat-teħid tal-kampun u d-dehra tal-kampjun tal-ilma (eż. kulur u nuqqas ta' ċarezza) għandhom jiġu nnutati (ara sezzjoni 3). Il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu u/jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis fl-ilma u fis-saff tan-naqal tal-wiċċ għandu jitkejjel sabiex juri l-kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma sakemm dan ma jkunx ovvju mid-dehra u mill-esperjenza storika tal-post. L-ilma tal-wiċċ għandu jinġarr f'kontenitur li hu mnaddaf sew. Waqt il-ġarr, it-temperatura tal-kampjun m'għandhiex teċċedi b'mod sinifikanti t-temperatura użata fit-test. Hu rakkomandat li tiġi mkessħa għal temperatura ta' 4 °C waqt il-ġarr jekk idum aktar minn 2 jew 3 sigħat. Il-kampjun tal-ilma m'għandux ikun iffriżat.

▼M1

1.8.4. **Il-ħżin u l-preparazzjoni tal-ilma tal-wiċċ**

It-test għandu jibda preferibbilment fi żmien ġurnata wara li jinġabar il-kampjun. Il-ħżin tal-ilma, jekk hemm bżonn, għandu jkun minimizzat u għall-ebda raġuni m'għandu jaqbeż massimu ta' 4 ġimgħat. Il-kampjun tal-ilma għandu jinżamm f'temperatura ta' 4 °C iċċarġjat b'gas sakemm jintuża. Qabel ma jintuża, il-partijiet l-irqaq ħorox għandhom jitneħħew, eż. billi jiġu iffiltrati minn ġo filter tan-najlon li x-xibka tiegħu tkun daqs 100 μm jew b'filter tal-karta ħoxna, jew billi jitħalla joqgħod ħalli n-naqal jinżel fil-qiegħ.

1.8.5. **Il-preparazzjoni tal-ilma miżjud bin-naqal (mhux obbligatorja)**

Għat-test tan-naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, in-naqal tal-wiċċ jiġi miżjud fil-fliexken li fihom ilma naturali (iffiltrat biex jitneħħew il-frak ħorox kif deskritt fis-sezzjoni 1.8.4.) biex tinkiseb is-sospensjoni; il-konċentrazzjoni ta' solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u fuq għandha tkun bejn 0,01 u 1 g/L. In-naqal tal-wiċċ għandu jkun ta' l-istess post minn fejn ittieħed il-kampjun ta' l-ilma. Skont l-ambjent akwatiku partikulari, in-naqal tal-wiċċ jista' jew ikun karatterizzat minn kontenut għoli ta' karbonju organiku (2.5-7.5 %) u konsistenza fina jew minn kontenut baxx ta' karbonju organiku (0.5-2.5 %) u konsistenza ħarxa (3). In-naqal tal-wiċċ jista' jiġi preparat kif ġej: ħu diversi biċċiet min-nofs tan-naqal billi tuża tubu trasparenti tal-plastik, neħħilu s-saffi ta' fuq li jeħtieġu l-ossiġnu (mill-wiċċ sa fond ta' massimu ta' 5 mm) eżatt wara li jittieħed il-kampjun u itfagħhom flimkien. Il-kampjun li joħroġ tan-naqal għandu jinġarr ġo kontenitur li l-parti ta' fuq tiegħu hi kbira biżżejjed għall-arja biex iżomm lin-naqal f'kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu (kessħu għal 4 °C jekk il-ġarr idum aktar minn 2-3 sigħat). Il-kampjun tan-naqal għandu jinżamm bejn il-qiegħ u l-wiċċ fl-ilma tat-test fi proporzjon ta' 1:10 u jinżamm f'temperatura ta' 4 °C iċċarġjat bil-gass sakemm jintuża. Il-ħżin tan-naqal, jekk hemm bżonn, għandu jkun minimizzat u m'għandux jaqbeż massimu ta' 4 ġimgħat.

1.8.6. **Proċedura semi-kontinwa (mhux obbligatorja)**

L-inkubazzjoni fit-tul (diversi xhur) tista' tkun meħtieġa jekk il-perjodu tad-dewmien isir qabel ma tkun tista' titkejjel diżintegrazzjoni sinifikanti tas-sustanza tat-test. Jekk din tkun magħrufa minn testijiet imgħoddija tas-sustanza, it-test jista' jinbeda permezz tal-proċedura semi-kontinwa, li tagħti lok għal tiġdid perjodiku ta' parti mill-ilma tat-test jew mis-sospensjoni (ara Anness 2). Inkella, it-test normali fuq grupp jista' jinbidel b'test semi-kontinwu, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test intlaħqet matul madwar 60 ġurnata ta' testjar billi ntużat il-proċedura tal-grupp (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.8.3).

1.8.7. **Żieda tas-sustanza tat-test (jew ta' referenza)**

Għal dawk is-sustanzi li jinħallu malajr fl-ilma (> 1 mg/L) u jevaporaw ftit (bir-regola ta' *Henry* kostanti < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ jew < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), taħlita tal-kwantità tista' tiġi ppreparata fl-ilma mingħajr *ions* (ara sezzjoni 1.8.2); il-volum addattat tal-kwantità jiġi miżjud fil-konteniturі tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni mixtieqa. Il-volum ta' xi kwantità tat-taħlita għandu jkun il-minimu prattiku (< 10 % tal-volum tal-likwidu finali, jekk jista' jkun). Proċedura oħra hi li s-sustanza tat-test tiġi maħlula f'volum akbar ta' ilma tat-test, li tista' tidher bħala alternattiva għall-użu ta' aġenti orġaniċi li jinħallu.

▼M1

Jekk ma jkunx possibbli, it-taħlitiet tal-kwantità ta' sustanzi li ma jevaporawx malajr u li ma jinħallux malajr fl-ilma għandhom ikunu preparati permezz ta' aġent organiku li jinħall u li jevapora malajr, iżda l-ammont tal-aġent li jinħall miżjuda mas-sistema tat-test m'għandux jeċċedi il-1 % v/v u m'għandux iħalli effetti ħżiena fuq l-attività tal-mikroorganiżmi. L-aġent li jinħall m'għandux jaffettwa l-istabbilità tas-sustanza tat-test fl-ilma. L-aġent li jinħall m'għandux jitneħħa fi kwantità żgħira tant li ma żżidx b'mod sinifikanti l-konċentrazzjoni *DOC* ta' l-ilma tat-test jew is-sospensjoni. Dan għandu jkun iċċekkjat bl-analiżi tas-sustanza speċifika jew, jekk jista' jkun, permezz ta' analiżi *DOC* (6). Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi llimitat l-ammont ta' aġent li jinħall trasferit għal dak li hu assolutament neċessarju, u biex ikun żgurat li l-ammont tas-sustanza tat-test tista' tinħall fil-volum finali ta' l-ilma tat-test. Jistgħu jintużaw tekniki oħra biex tiddaħħal is-sustanza tat-test fil-kontenituri tat-test kif deskritt f'(7) u (8). Meta aġent organiku li jinħall jintuża għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, il-kontrolli tal-aġent li jinħall li fihom l-ilma tat-test (mingħajr żidiet) u l-ilma tat-test bis-sustanza ta' referenza miżjuda għandhom ikunu ttrattati bl-istess mod bħall-kontenituri attivi tat-test miżjuda bis-sustanza tat-test f'dak li jġorr l-aġent li jinħall. L-iskop tal-kontrolli tal-aġent li jinħall hu biex jiġu eżaminati xi effetti negattivi li jistgħu jkunu kkawżati mill-aġent li jinħall fuq il-popolazzjoni tal-mikroorganiżmi kif indikat mid-diżintegrazzjoni tas-sustanza ta' referenza.

1.8.8. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.8.8.1. *Temperatura tat-test*

L-inkubazzjoni għandha ssir fid-dlam (preferibbilment) jew f'dawl batut b'temperatura kkontrollata (± 2 °C), li tista' tkun it-temperatura tal-esperiment jew it-temperatura standard ta' 20-25 °C. It-temperatura tal-esperiment tista' tkun jew it-temperatura proprja tal-kampjun ta' meta jittieħed il-kampjun jew it-temperatura medja tal-esperiment fil-post fejn jittieħed il-kampjun.

1.8.8.2. *Ċaqliq*

Iċ-ċaqliq permezz ta' ċaqliq jew tħawwid kontinwu għandu jsir biex il-partikuli ż-żgħar u l-mikroorganiżmi jkunu miżmuma xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ. Iċ-ċaqliq jgħin ukoll biex jiġi trasferit l-ossiġnu mill-parti ta' fuq għal-likwidu sabiex il-kundizzjonijiet fejn ikun meħtieġ l-ossiġnu jistgħu jinżammu b'mod adegwat. Qiegħed il-fliexken fuq mejda li titriegħed (madwar 100 rpm ta' ċaqliq) jew uża xi ħaġa manjetika biex tħawwad. Iċ-ċaqliq irid ikun kontinwu. Iżda, iċ-ċaqliq jew it-tħawwid għandu jsir bil-mod kemm jista' jkun, filwaqt li jinżamm f'livell uniformi x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

1.8.8.3. *Tul tat-test*

It-test m'għandux idum aktar minn 60 jum sakemm ma tkunx qed tiġi applikata l-proċedura semi-kontinwa bit-tiġdid perjodiku tat-test ta' sospensjoni (ara sezzjoni 1.8.6 u Anness 2). Madankollu, il-perjodu tat-test għat-test tal-grupp jista' jkun estiż għal massimu ta' 90 ġurnata, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test bdiet fl-ewwel 60 jum. Id-diżintegrazzjoni hi monitorjata, f'intervalli tal-ħin addattati, billi tkun magħrufa l-attività ^{14}C tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni jew $^{14}CO_2$ evolut (ara sezzjoni 1.8.9.4) u/jew permezz ta' analiżi kimika (sezzjoni 1.8.9.5). Il-ħin tal-inkubazzjoni għandu jkun twil biżżejjed biex jevalwa l-proċess ta' diżintegrazzjoni. L-ammont ta' diżintegrazzjoni preferibbilment għandu jeċċedi 50 %; għas-sustanzi li jiddiżintegraw bil-mod, l-ammont ta' diżintegrazzjoni għandu jkun biżżejjed (normalment aktar minn 20 % diżintegrazzjoni) sabiex jiżgura li tiġi stmata r-rata kostanti ta' diżintegrazzjoni tal-moviment.

▼M1

Kejl perjodu tal-*pH* u l-konċentrazzjoni tal-ossiġnu fis-sistema tat-test għandu jsir sakemm dan ma jkunx meħtieġ minħabba esperjenzi mgħoddija minn testi simili bil-kampjuni ta' l-ilma u n-naqal miġbura mill-istess post. Taħt xi kundizzjonijiet, il-metaboliżmu tas-sottostrati primarji f'konċentrazzjonijiet aktar għolja fl-ilma jew in-naqal jistgħu jwasslu għall-evoluzzjoni biżżejjed tas-CO_2 u t-tneħħija tal-ossiġnu biex li jbiddlu b'mod sinifikanti l-kundizzjonijiet esperimentali waqt it-test.

1.8.9. **Il-Proċedura**

1.8.9.1. *Il-preparazzjoni tal-fliexken għat-test fil-baħar miftuħ*

Ittrasferixxi volum addattat ta' ilma tat-test fil-fliexken tat-test, sa qisu terz tal-volum tal-flixkun u mhux anqas minn madwar 100 ml. Jekk jintużaw diversi fliexken (biex ikunu jistgħu jiġu magħrufa l-konsegwenzi tal-fliexken kollha kull meta jittieħdu l-kampjuni), il-volum addattat tal-ilma tat-test hu kważi wkoll ta' madwar 100 ml, għaliex volumi żgħar tal-kampjuni jistgħu jinfluwenzaw it-tul tal-fażi tad-dewmien. Is-sustanza tat-test hi miżjuda mit-taħlita tal-kwantità kif deskritta fis-sezzjonijiet 1.8.2 u 1.8.7. Tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test li jvarjaw b'fattur ta' 5 sa 10 għandhom jintużaw sabiex ikunu magħrufa l-movimenti tad-diżintegrazzjoni u biex tiġi kalkolata r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni tal-moviment. Iż-żewġ konċentrazzjonijiet magħżula għandhom ikunu inqas minn 100 µg/L u preferibbilment inqas minn < 1-10 µg/L.

Agħlaq il-fliexken bit-tappijiet jew għotjien li minnhom ma tistax tgħaddi arja u CO_2. Għall-kimiċi tat-test li ma jevaporawx ta' ^{14}C li m'għandhomx isem, biċċiet tat-tajjar huma addattati biex jintużaw bħala tappijiet biex jevitaw kontaminazzjoni mill-arja (ara sezzjoni 1.8.1) dejjem jekk xi prodotti maġġuri ta' diżintegrazzjoni huma magħrufa li ma jevaporawx, u jekk tintuża' determinazzjoni tas-CO_2 indiretta (ara Anness 3).

Inkuba l-fliexken fit-temperatura magħżula (ara sezzjoni 1.8.8.1). Neħħi l-kampjuni għall-analiżi kimika jew il-kejl ^{14}C fil-bidu tat-test (jiġifieri qabel ma tibda d-diżintegrazzjoni; ara sezzjoni 1.7.1) u mbagħad f'intervalli tal-ħin addattati matul it-test. It-teħid tal-kampjuni jista' jsir billi jitneħħew is-sotto kampjuni (eż. 5 ml tal-kampjuni) minn kull repetizzjoni tal-esperiment jew permezz tal-esperjenza tal-konsegwenzi tal-fliexken kollha meta jittieħdu l-kampjuni. Il-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test tista' tinstab direttament jew indirettament (ara Anness 3). Normalment, ikun meħtieġ minimu ta' ħames postijiet fejn jittieħdu kampjuni waqt il-fażi tad-diżintegrazzjoni (jiġifieri wara li tintemm il-fażi tad-dewmien) sabiex tkun stmata r-rata kostanti affidabbli, sakemm ma jkunx ġustifikat li tliet postijiet tat-teħid ta' kampjuni huma biżżejjed għas-sustanzi li jiddiżintegraw malajr. Għas-sustanzi li ma jiddiżintegrawx malajr jista' jsir faċilment aktar kejl waqt il-fażi tad-diżintegrazzjoni u, għalhekk, għandhom jintużaw aktar postijiet tad-data biex tkun stmata k. L-ebda skeda tal-ħin fissa għat-teħid ta' kampjuni ma tista' tkun stipulata, għaliex ir-rata ta' bijodegradabbiltà tvarja; madankollu hu rakkomandat li jittieħed kampjun darba f'ġimgħa jekk id-diżintegrazzjoni tkun baxxa. Jekk is-sustanza tat-test tiddiżintegra malajr, it-teħid ta' kampjuni għandu jsir darba kuljum fl-ewwel tlett ijiem u mbagħad kull tieni jew tielet ġurnata. Taħt ċerti ċirkostanzi, bħal b'sustanzi li jkollhom azzjoni kimika mgħaġġla ħafna fl-ilma, ikun meħtieġ li jittieħdu kampjuni f'intervalli ta' siegħa. Hu rrikmandat li jsir studju preliminari qabel it-test sabiex ikunu magħrufa l-intervalli addattati tat-teħid ta' kampjuni. Jekk il-kampjuni jridu jkunu disponibbli għal aktar analiżi speċifika, ta' min jieħu aktar kampjuni u mbagħad jintgħażlu dawk li jridu jiġu analizzati fl-aħħar tal-esperiment wara li tintuża strateġija b'lura, jiġifieri l-aħħar kampjuni jiġu analizzati l-ewwel (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5 għal gwida dwar l-istabbilità tal-kampjuni waqt il-ħżin).

▼**M1**

1.8.9.2. *Numru ta' fliexken u kampjuni*

Lesti numru biżżejjed ta' fliexken tat-test biex ikollok:

— fliexken tat-test; tal-inqas fliexken doppji għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (preferibbilment minimu ta' 3) jew diversi fliexken tat-test għal kull konċentrazzjoni, jekk fliexken tat-test sħaħ jiġu pproċessati kull darba li jittieħdu l-kampjuni (simbolizzata F_T),

— fliexken tat-test għall-kalkolazzjoni tal-bilanċ tal-piż; tal-inqas fliexken doppji għal kull konċentrazzjoni tat-test (simbolizzata F_M),

— kontroll vojt, l-ebda sustanza tat-test; tal-inqas tal-flixkun tat-test vojt li fih biss l-ilma tat-test (simbolizzata F_B),

— kontroll ta' referenza; flixkien doppji bis-sustanza ta' referenza (eż. *aniline* jew *sodium benzoate* f'10 μg/l) (simbolizzata F_C). L-iskop tal-kontroll tar-referenza hu li jiġi kkonfermat minimu ta' attività tal-mikroorganiżmi. Jekk hu konvenjenti, sustanza ta' referenza mmarkata bir-raġġi tista' tintuża, anki meta d-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test tiġi mmonitorjata permezz ta' analiżi kimika,

— kontroll li ma fihx mikroorganiżmi; wieħed jew aktar mill-fliexken li fihom ilma tat-test mingħajr mikroorganiżmi biex tkun eżaminata d-diżintegrazzjoni mhux ħajja li jista' jkun hemm jew xi tneħħija oħra li mhix bijoloġika tas-sustanza tat-test (simbolizzata F_S). L-attività bijoloġika tista' titwaqqaf permezz ta' sterilizzazzjoni bi pressjoni għolja taħt stim (121 °C; 20 min) tal-ilma tat-test jew billi jiġi miżjud tossikant (eż. *sodium azide* (NaN_3) f'10-20 g/l, *chloride* tal-merkurju ($HgCl_2$) f'100 mg/l jew *formalin* f'100 mg/l jew billi tiġi esposta għar-raġġi gamma. Jekk jintuża $HgCl_2$, għandhom jiddisponu minnu bħala skart tossiku. Għall-ilma miżjud bin-naqal f'ammont kbir, mhux faċli li jinkisbu l-kundizzjonijiet li ma jkunx fihom mikroorganiżmi; f'dan il-każ hu irrikkmandat li ssir aktar minn sterilizzazzjoni waħda bi pressjoni għolja tal-istim (eż. tliet darbiet). Ta' min iqis li l-karatteristiċi tas-*sorption* tan-naqal jistgħu jinbidlu meta ssir l-isterilizzazzjoni bi pressjoni għolja tal-istim,

— kontrolli tal-aġenti li jħollu, li fihom l-ilma tat-test u l-ilma tat-test bis-sustanza ta' referenza; fliexken doppji trattati bl-istess ammont ta' aġent li jinħall u bl-użu tal-istess proċedura bħal dik użata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. L-iskop hu li jiġu eżaminati xi effetti ħżiena tal-aġent li jinħall billi tkun magħrufa d-diżintegrazzjoni tas-sustanza ta' referenza.

Fit-tfassil tat-test, l-investigatur għandu jqis l-importanza relattiva ta' żjieda fir-repetizzjoni tal-esperiment kontra żjieda fin-numru ta' ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni. In-numru eżatt ta' fliexken meħtieġa jiddependi mill-metodu użat biex titkejjel id-diżintegrazzjoni (ara t-tielet paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1.; sezzjoni 1.8.9.4 u Anness 3).

▼**M1**

Għandhom jittieħdu żewġ sotto kampjuni (eż. 5 ml kampjuni) minn kull flixkun tat-test kull meta jittieħdu l-kampjuni. Jekk jintużaw diversi fliexken biex ikunu jistgħu jiġu pproċessati fliexken sħaħ, minimu ta' żewġ fliexken għandu jkun issagrifikat kull meta jittieħdu l-kampjuni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Preparazzjoni tal-fliexken għat-test tan-naqal sospiż [mhux obbligatorju]*

Żid il-volumi meħtieġa ta' ilma tat-test u n-naqal, jekk hemm bżonn, fil-kontenituri tat-test (ara sezzjoni 1.8.5). Il-preparazzjoni tal-fliexken għat-test tan-naqal sospiż huwa l-istess bħal dak għat-test li jsir fil-baħar miftuħ (ara s-sezzjonijiet 1.8.9.1 u 1.8.9.2). Jekk jista' jkun użat fliexken tas-*serum* jew fliexken ta' għamla simili. Qiegħed il-fliexken magħluqa mimduda fuq dak li jregħedhom. Ovvjament, fliexken miftuħa għal sustanzi li ma jevaporawx ta' ^{14}C mhux mogħtija isem, għandhom jitqegħdu fil-pożizzjoni wieqfa, f'dan il-każ hu rrikkmandat li jsir tħawwid manjetiku u l-użu ta' *bars* manjetiċi miksija bil-ħġieġ. Jekk hemm bżonn, iċċarġja l-fliexken bil-gass biex iżżomm il-kundizzjonijiet xierqa li jkunu jeħtieġu l-ossiġnu.

1.8.9.4. *Determinazzjonijiet radjokemikali*

Is$^{-14}CO_2$ evolut jitkejjel indirettament u direttament (ara Anness 3). Is$^{-14}CO_2$ jiġi magħruf indirettament permezz tad-differenza bejn l-attività ^{14}C inizjali fl-ilma tat-test jew is-sospensjoni u l-attività totali tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni meta jittieħdu l-kampjuni kif jitkejlu wara li l-kampjun ikun mimli bl-aċtu għal ph 2-3 u jitneħħa s-CO_2. Il-karbonju inorganiku għalhekk jitneħħa u l-attività mkejla tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni tiġi minn materjal organiku. L-għarfien indirett tas$^{-14}CO_2$ m'għandux jintuża', jekk il-prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri li jevaporaw malajr jiffurmaw waqt it-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test (ara Anness 3). Jekk jista' jkun, l-evoluzzjoni $^{14}CO_2$ għandha titkejjel direttament (ara Anness 3) kull meta jittieħdu l-kampjuni f'tal-inqas flixkun wieħed tat-test, din il-proċedura tagħti lok biex ikunu ċċekkjati l-bilanċ tal-piż u l-proċess tal-bijodegradazzjoni, iżda hi ristretta għat-testijiet li jsiru fuq il-fliexken magħluqa.

Jekk is$^{-14}CO_2$ evolut jitkejjel direttament waqt it-test, aktar fliexken għandhom jiġu ppreparati għal dan il-għan fil-bidu tat-test. Hu rrikkmandat li tkun magħrufa b'mod dirett is$^{-14}CO_2$, jekk prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri li jevaporaw malajr jiġu ffurmati waqt it-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test. F'kull post ta' kejl il-fliexken tat-test l-oħra jimtlew bl-aċtu għal pH2-3 u s$^{-14}CO_2$ jinġabar f'assorbitur intern jew estern (ara Anness 3).

Hemm ukoll l-għażla fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test imsemmiija ^{14}C u prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri jistgħu jkunu magħrufa permezz tar-radjokromatografija (eż. kromatografija ta' saff irqiq, *RAD-TLC*) jew HPLC li taqbad ir-radjokimiċi.

Għażla oħra tista' tkun il-fażi tat-tqassim tar-radjoattività li fadal (ara Anness 1) u s-sustanza tat-test li jifdal wara l-evaporazzjoni u l-prodotti tat-trasformazzjoni jistgħu jiġu ddeterminati.

▼**M1**

Fl-aħħar tat-test il-bilanċ tal-piż għandu jkun determinat permezz ta' kejl dirett tas-$^{14}CO_2$ bl-użu ta' fliexken separati tat-test li minnhom ma jittieħdu l-ebda kampjuni waqt it-test (ara Anness 3).

1.8.9.5. *Analiżi kimika speċifika*

Jekk ikun hemm metodu analitiku sensittiv speċifiku, il-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi evalwata billi titkejjel il-konċentrazzjoni totali li jkun fadal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test minflok l-użu ta' tekniki li jimmarkaw bir-raġġi. Jekk tintuża' sustanza tat-test immarkata bir-raġġi (biex titkejjel il-mineralizzazzjoni totali), analiżi kimiċi speċifiċi jistgħu jsiru fl-istess ħin biex jagħtu informazzjoni oħra utli u biex jiċċekkjaw il-proċedura. Analiżi kimika speċifika tista' tintuża wkoll biex jitkejjlu l-prodotti ta' trasformazzjoni ffurmati waqt id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test, u dan hu rrikkmandat għas-sustanzi li huma mineralizzati b'nofs ħajjiet li jeċċedu 60 ġurnata. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni kull meta jittieħdu l-kampjuni għandhom jiġu mkejla u jsir rapport dwarhom (bħala konċentrazzjoni u bħala persentaġġ ta' dik applikata). Ġeneralment, il-prodotti tat-trasformazzjoni li jinstabu f'≥ 10 % tal-konċentrazzjoni applikata fi kwalunkwe ħin meta jittieħdu l-kampjuni għandhom ikunu identifikati sakemm ma jkunux hemm raġunijiet oħra ġustifikati biex isir mod ieħor. Il-prodotti ta' trasformazzjoni li għalihom dejjem qed jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet waqt l-istudju għandhom ukoll jitqiesu fl-identifikazzjoni, anki jekk il-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jeċċedux il-limitu msemmi hawn fuq, għaliex dawn jistgħu jindikaw persistenza. L-analiżi tal-prodotti ta' trasformazzjoni fil-kontrolli ta' sterilizzazzjoni għandha titqies, jekk trasformazzjoni mhux ħajja mgħaġġla tas-sustanza tat-test (eż. idrolisi) tista' tiġri. Il-bżonn ta' kwantifikazzjoni u identifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni għandhom jitqiesu każ b'każ, u jingħataw ġustifikazzjonijiet għalihom fir-rapport. Tekniki biex jiġu estratti permezz tal-aġent organiku li jinħall għandhom ikunu applikati skont id-direzzjonijiet mogħtija fil-proċedura analitika rispettiva.

Il-kampjuni kollha għandhom jinħażnu f'temperatura ta' 2 sa 4 °C u jiġu ssiġġillati biex ma tidħolx arja jekk l-analiżi ssir fi żmien 24 siegħa (jekk hu possibbli). Għal ħżin aktar fit-tul, il-kampjuni għandhom ikunu ffriżati taħt temperatura ta' – 18 °C jew ippriservati kimikament. L-użu ta' l-aċtu biex jiġu ppriservati l-kampjuni mhux metodu rrikmandat, għaliex il-kampjuni bl-aċtu jistgħu jkunu instabbli. Jekk il-kampjuni ma jiġux analizzati fi żmien 24 siegħa u mhumiex soġġetti għall-ħżin aktar fit-tul, għandu jsir studju dwar l-istabbilità tal-ħżin biex juru l-istabbiltà tal-kimiċi li hemm interess fihom taħt temperatura tal-ħżin ta' – 18 °C jew kundizzjonijiet ippriservati. Jekk il-metodu analitiku jinvolvi jew li jiġi estratt l-aġent li jinħall jew il-faži li jiġi estratt is-solidu (*SPE*), l-estrazzjoni għandha ssir mall-ewwel wara li jittieħdu l-kampjuni jew wara li jinħażen il-kampjun miżmum fil-friġġ għal massimu ta' 24 siegħa.

Skont is-sensittività tal-metodu analitiku, jista' jkun hemm bżonn volum ta' kampjuni akbar minn dawk indikati fil-paragrafu 1.8.1. It-test jista' jsir faċilment bil-volumi tat-test ta' litru fi fliexken b'volum ta' 2-3 litri, li bis-saħħa t'hekk ikunu jistgħu jinġabru kampjuni ta' madwar 100 ml.

▼M1

2. **DATA U RAPPURTAR**

2.1. KIF JIĠU TRATTATI R-RIŻULTATI

2.1.1. **Il-Plot tad-data**

Qarreb il-ħinijiet tat-teħid ta' kampjuni għal numru sħiħ ta' sigħat (sakemm is-sustanza ma tiddiżintegrax ħafna fi ftit minuti jew sigħat) iżda mhux għal numru sħiħ ta' ġranet. Ipplottja l-estimi tal-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test (għas-sustanzi msemmija ^{14}C) jew il-konċentrazzjoni li jkun fadal wara l-evaporazzjoni (għal sustanzi li mhux mogħtija isem), kontra l-ħin kemm fi plot lineari kif ukoll semi-logaritmiku (ara Figuri 1a, 1b). Jekk saret id-diżintegrazzjoni, qabbel ir-riżultati mill-fliexken F_T ma' dawk mill-fliexken F_S. Jekk il-medji tar-riżultati mill-fliexken bis-sustanza tat-test (F_T) u l-fliexken li ma fihomx mikro-organiżmi (F_S) jvarjaw b'inqas minn 10 %, wieħed jista' jassumi li d-diżintegrazzjoni osservata hi l-aktar waħda mhux ħajja. Jekk id-diżintegrazzjoni fil-fliexken F_S hi ibaxx, il-figuri jistgħu jintużaw biex isewwu dawk miksuba bil-fliexken F_T (billi jitnaqqsu minnhom) sabiex ikun stmat il-livell ta' bijodegradazzjoni. Meta jsiru analiżi mhux obbligatorji għall-prodotti maġġuri ta' trasformazzjoni, għandhom jingħataw plots tal-formazzjoni u l-waqgħa tagħhom flimkien ma' plot tal-waqgħa tas-sustanza tat-test.

Ħu stima tat-tul tal-faża tad-dewmien t_L mill-kurva tad-diżintegrazzjoni (plot semi-logaritmiku) billi tislet il-parti lineari tad-diżintegrazzjoni żero jew inkella billi tiddetermina l-ħin għal madwar 10 % diżintegrazzjoni (ara Figuri 1a u 1b). Mill-plot semi-logaritmiku, ħu stima tar-rata tal-ewwel ordni kostanti, k, u l-iżball standard tagħha permezz ta' rigress linear ta' ln (attività ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni jew il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test) kontra l-ħin. Bil-kejl ^{14}C b'mod partikolari, uża biss data li tappartjeni għall-parti lineari tal-bidu tal-kurva wara li tkun intemmet il-faża tad-dewmien, u agħti preferenza biex tagħżel ftit data u li tkun rappreżentattiva aktar milli tagħżel numru akbar ta' data aktar inċerta. L-inċertezza ħawnhekk tinkludi żbalji interni fl-użu dirett irrikmandat tal-attivitajiet ^{14}C imkejla li jifdal wara l-evaporazzjoni (ara ħawn taħt). Xi kultant ikun relevanti li tikkalkula żewġ rati kostanti differenti, jekk id-diżintegrazzjoni ssegwi mudell f'żewġ fażijiet. Għal dan il-għan huma mfissra żewġ fażijiet differenti tal-kurva tad-diżintegrazzjoni. Il-kalkolazzjonijiet tar-rata kostanti k, u n-nofs ħajja $t_{½}$ = ln2/k, għandhom isiru għal kull wieħed mill-fliexken individwali repetuti tal-esperiment, meta jittieħdu sotto kampjuni mill-istess flixkun, jew billi jintużaw il-valuri medja, meta l-fliexken kollha huma ipproċessati kull meta jittieħdu l-kampjuni (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.2). Meta tintuża l-proċedura msemmija l-ewwel, ir-rata kostanti u n-nofs ħajja għandhom ikunu rrappurtati għal kull wieħed mill-fliexken individwali repetuti tal-esperiment u bħala valur medju bl-iżball standard. Jekk intużaw konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, il-kurva tad-diżintegrazzjoni tista' tiddevja sew minn linja dritta (plot semi-logaritmiku) u l-movimenti tal-ewwel ordni jistgħu ma jkunux validi. Għalhekk ma jagħmilx sens li tiġi spjegata nofs ħajja. Madankollu, għal firxa limitata ta' data, movimenti tal-ewwel ordni li jixxiebhu jistgħu jiġu applikati u tkun stmata d-diżintegrazzjoni ta' nofs il-ħin DT_{50} (ħin biex tintlaħaq 50 % diżintegrazzjoni). Madankolli, ta' min iżomm f'moħħu, li t-tul ta' ħin tad-diżintegrazzjoni lil hinn mill-firxa ta' data magħżula ma jistax ikun previst bl-użu ta' DT_{50} li hu sempliċement dak li jiddeskrivi sett ta' data partikolari. Jeżistu għodda analitiċi li jiffaċilitaw il-kalkolazzjonijiet statistiċi u t-tpinġija tal-kurva u l-użu ta' dan it-tip ta' *software* hu irrikmandat.

▼M1

Jekk isiru analiżi kimiċi speċifiċi, ħu stima tar-rata tal-kostanti u tan-nofs ħajjiet għad-diżintegrazzjoni primarja bħal t'hawn fuq għal mineralizzazzjoni totali. Jekk id-diżintegrazzjoni primarja hi l-proċess li jillimita jistgħu xi kultant jintużaw punti tad-data mill-proċess kollu tad-diżintegrazzjoni. Dan jiġri minħabba li l-kejl huwa dirett b'kuntrast mal-kejl tal-attività ^{14}C.

Jekk jintużaw sustanzi msemmija ^{14}C, bilanċ tal-piż għandu jkun imfisser f'persentaġġ tal-konċentrazzjoni applikata tal-bidu, tal-inqas fl-aħħar tat-test.

2.1.2. **Attività li jifdal wara l-evaporazzjoni**

Meta l-parti msemmija ^{14}C ta' sustanza organika tkun bijodegradata, il-parti l-kbira tal–^{14}C tkun maqluba f'$^{14}CO_2$, filwaqt li parti oħra tintuża' għat-tkabbir tal-piż kollu tal-organiżmi u/jew sintesi ta' sustanzi extra-ċellulari meħtieġa għall-metaboliżmu. Għalhekk, il-bijodegradazzjoni' finali' kompluta ta' sustanza ma twassalx biex jiġi ikkonvertit 100 % tal-karbonju tagħha f'$^{14}CO_2$. Il–^{14}C li hemm fil-prodotti ffurmati bil-bijosinteżi hi sussegwentement merħija bil-mod bħala $^{14}CO_2$ minħabba "l-mineralizzazzjoni sekondarja". Għal dawn ir-raġunijiet il-plots tal-attività organika ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni (mkejla wara li jitneħħa s-CO_2) jew tas-$^{14}CO_2$ prodott kontra l-ħin juru "parti inferjuri" wara li tkun tlestiet id-diżintegrazzjoni. Dan jikkumplika l-interpretazzjoni kinetika tad-data u għal dan il-għan, il-parti inizjali tal-kurva biss (wara li tkun intemmet il-fażi tad-dewmien u qabel ma tkun intlaħqet madwar 50 % diżintegrazzjoni) għandha tintuża' normalment biex tkun stmata r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni. Jekk is-sustanza tat-test tiġi diżintegrata, l-attività totali organika ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni hi dejjem ogħla mill-attività ^{14}C assoċjata mas-sustanza tat-test intatta li jifdal. Jekk is-sustanza tat-test hi diżintegrata bir-reazzjoni ta' l-ewwel ordni u frazzjoni kostanti α hi mibdula fil-minerali CO_2, in-niżla inizjali tal–^{14}C kurva li tisparixxi (organika totali ^{14}C kontra l-ħin) se tkun α immultiplikata bin-niżla tal-kurva korrispondenti għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (jew, biex inkunu preċiżi, il-parti tas-sustanza tat-test mogħtija l-isem ^{14}C). Bl-użu tal-kejl tal-attività totali organika ^{14}C mhux ikkoreġuta, ir-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni ikkalkulata se tkun għalhekk konservattiva. Proċeduri biex ikunu stmati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mill-attivitajiet radjokimiċi mkejla bbażati fuq diversi ipotesi ta' simplifikazzjoni ġew deskritti fil-letteratura (2)(9)(10)(11). Dawk il-proċeduri huma faċilment applikabbli għal sustanzi li jiddiżintegraw malajr.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Jekk jinstab li k hi indipendenti mill-konċentrazzjoni miżjuda (jiġifieri jekk il-k ikkalkulata hi kważi l-istess f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test), wieħed jista' jassumi li r-rata kostanti ta' l-ewwel ordni hi rappreżentattiva tal-kundizzjonijiet ta' l-ittestjar użati, jiġifieri s-sustanza tat-test, il-kampjun ta' l-ilma, u t-temperatura tat-test. Sa fejn jistgħu jiġu ġeneralizzati r-riżultati jew estiżi għal sistemi oħra jrid ikun evalwat billi jiġġudikahom espert. Jekk tintuża' konċentrazzjoni għolja tas-sustanza tat-test, u għalhekk id-diżintegrazzjoni ma ssegwix il-movimenti tal-ewwel ordni, id-data ma tistax tintuża' għal stima diretta tar-rata kostanti tal-ewwel ordni jew in-nofs ħajja korrispondenti. Madankollu, data meħuda minn test li juża' konċentrazzjoni għolja tas-sustanza tat-test tista' xorta tibqa' tajba biex ikun stmat l-ammont ta' mineralizzazzjoni totali u/jew biex ikunu misjuba u kwantifikati l-prodotti ta' trasformazzjoni.

▼M1

Jekk ikunu magħrufa r-rati ta' proċessi oħra ta' telf barra l-bijodegradazzjoni (eż l-idroliżi jew l-evaporazzjoni mgħaġġla), huma jistgħu jitnaqqsu mir-rata ta' telf netta osservata waqt it-test biex tingħata stima approssimattiva tar-rata tal-bijodegradazzjoni. Id-data għall-idroliżi tista', eż. tinkiseb mill-kontroll li ma fihx mikro-organiżmi jew mill-ittestjar fl-istess ħin billi tintuża' konċentrazzjoni ogħla tas-sustanza tat-test.

L-għarfien indirett u dirett tas $^{-14}CO_2$ (sezzjoni 1.8.9.4 u Anness 3) jista' jintuża biss biex ikejjel sa fejn saret il-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test f'CO_2Ir-radjokromatografija (*RAD-TLC*) jew il-*HPLC* jistgħu jintużaw biex janalizzaw il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C u l-iffurmar ta' prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri (t-tielet paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.4). Biex tkun tista' ssir stima diretta tan-nofs ħajja, jeħtieġ li ma jkun hemm l-ebda prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri (mfissra bħala ≥ 10 % tal-ammont applikat tas-sustanza tat-testJekk ikun hemm prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri kif imfissra hawnhekk, jeħtieġ li jkun hemm evalwazzjoni dettaljata tad-dataDin tista' tinkludi testjar imtenni u/jew identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5) sakemm id-destin tal-prodotti ta' trasformazzjoni ma jistax ikun evalwat sew mill-esperjenza (eż. informazzjoni dwar ir-rotot tad-diżintegrazzjoni). Peress li l-proporzjon tal-karbonju tas-sustanza tat-test mibdul f'CO_2 ivarja (l-aktar skont il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u sottostrati oħra li jkun hemm, il-kundizzjonijiet tat-test u l-komunità tal-mikroorganiżmi), dan it-test ma jagħtix lok biex issir stima faċli tal-bijodegradazzjoni finali bħal f'test dgħajjef *DOC*; iżda r-riżultat huwa simili għal dak miksub permezz ta' test respirometriku. L-ammont ta' mineralizzazzjoni għalhekk ikun inqas minn jew ugwali għal-livell minimu ta' bijodegradazzjoni finaliBiex tinkiseb stampa aktar sħiħa tal-bijodegradazzjoni finali (l-mineralizzazzjoni u l-inkorporazzjoni fil-piż ta' l-organiżmi), l-analiżi tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C għandha ssir fl-aħħar tat-test (ara l-Anness 1). Il ^{-14}C fl-għadira tal-partikuli separati se tkun magħmula minn ^{14}C inkorporati fil-piż tal-mikroorganiżmi batteriċi u ^{14}C iffurmati b'lura f'partikuli organiċi.

2.3. VALIDITÀ TAT-TEST

Jekk is-sustanza ta' referenza mhix diżintegrata fl-intervall tal-ħin mistenni (għal *aniline* u *sodium benzoate*, normalment inqas minn ġimagħtejn), il-validità tat-test tkun suspettata u trid tkun ivverifikata aktar, jew inkella t-test għandu jiġi mtenni b'kampjun ġdid tal-ilma. F'*ring* test ISO tal-metodu fejn seba' laboratorji li jinsabu madwar l-Ewropa ippartečipaw, il-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni addattati għall-*aniline* varjaw minn 0,3 għal 1.7 ġurnata^{-1} b'medja ta' 0,8 d^{-1} f' 20 °C u żball standard ta' ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0.9 ġranet). Ħinijiet tipiċi tad-dewmien kienu 1 sa 7 ijiem. L-ilmijiet eżaminati ġew irrappurtati li kellhom piż totali tal-mikroorganiżmi batteriċi li jikkorrispondi għal 10^3 -10^4 *units* li jiffurmaw kolonja (*CFL*) kull ml. Ir-rati tad-diżintegrazzjoni fl-ilmijiet Ewropej tan-Nofs li huma rikki fin-nutrienti kienu akbar minn dawk fl-ilmijiet Nordiċi li huma relattivament neqsin min-nutrienti tal-pjanti, li jista' jkun dovut għall-istat differenti tan-nutrizzjoni jew qabel kienu esposti għal sustanzi kimiċi.

L-irkuprar totali (bilanċ tal-piż) fl-aħħar ta' l-esperiment għandu jkun bejn 90 % u 110 % għas-sustanzi immarkati bir-raġġi, filwaqt li l-irkuprar inizjali fil-bidu ta' l-esperiment għandu jkun bejn 70 % u 110 % għas-sustanzi li mhumiex imsemmija. Madankollu, il-firxiet indikati għandhom ikunu interpretati biss bħala miri u m'għandhomx jintużaw bħala kriterji biex jiġi aċċettat it-test.

▼M1

3. **RAPPORT TAT-TEST**

It-tip ta' studju, jiġifieri t-test f'baħar miftuħ jew it-test tan-naqal li jkun miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, għandu jkun dikjarat sew fir-rapport tat-test, li għandu jkun fih ukoll ta' l-inqas l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test u s-sustanza(i) ta' referenza:

— ismijiet komuni, ismijiet kimiċi (irrikmanda *IUPAC* u/jew ismijiet *CAS*), numri *CAS*, *formulas* strutturali) li jindikaw il-pożizzjoni ta' ^{14}C jekk tintuża' sustanza mmarkata bir-raġġi) u karatteristiċi relevanti fiżiko-kimiċi tat-test u s-sustanza ta' referenza (ara sezzjonijiet 1.5 u 1.6),

— ismijiet kimiċi, numri *CAS*, *formulas* strutturali (li jindikaw il-pożizzjoni ta' ^{14}C jekk tintuża sustanza immarkata bir-raġġi) u karatteristiċi fiżiko-kimiċi tas-sustanzi użati bħala standards għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni,

— il-purità (l-impuritajiet) tas-sustanzi tat-test u ta' referenza,

— il-purità radjokimika tal-attività kimika msemmija u speċifika (fejn jixraq).

Ilma tal-wiċċ:

L-informazzjoni minima li ġejja għall-kampjun tal-ilma meħud għandha tingħata:

— post u deskrizzjoni tas-sit fejn ittieħdu l-kampjuni inkluż, jekk jista' jkun, l-istorja tal-kontaminazzjoni,

— id-data u l-ħin tal-ġbir tal-kampjuni,

— in-nutrienti (N totali, l-ammonju, in-*nitrite*, in-*nitrate*, P totali, *orthophosphate* maħlul fl-ilma),

— il-fond tal-ġbir,

— id-dehra tal-kampjun (eż. il-kulur u kemm hu mdardar),

— id-*DOC* u t-*TOC*,

— il-*BOD*,

— it-temperatura u l-*pH* fl-istess post u ħin tal-ġbir,

— l-ossiġnu jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis (obbligatorju biss jekk il-kundizzjonijiet fejn jeħtieġu l-ossiġnu mhumiex ovvji),

— kemm fih melħ jew kemm jgħaddi minnu (fil-każ tal-ilma baħar u ilma ftit mielaħ),

— solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ (fil-każ ta' kampjun mdardar),

— jekk jista' jkun xi informazzjoni oħra relevanti dwar il-post fejn ittieħdu l-kampjunu fil-ħin meta ttieħdu (eż. data vera jew storika dwar ir-rata tat-tgelgil tax-xmajjar jew il-kurrenti tal-baħar, postijiet maġġuri li jbattlu 'l barra li huma viċin il-post u t-tip ta' tbattil, il-kundizzjonijiet tat-temp qabel il-ħin li fih ittieħdu l-kampjuni,

u l-informazzjoni mhux obbligatorja li ġejja:

— il-piż totali tal-mikroorganiżmi (eż. l-għadd dirett ta' l-*acridine orange* jew il-units li jiffurmaw kolonji),

▼**M1**

— karbonju inorganiku,

— konċentrazzjoni ta' *chlorophyll-a* bħala stima speċifika għall-piż totali tal-mikroorganiżmi ta' l-alka.

Barra minn hekk, l-informazzjoni li ġejja dwar in-naqal għandha tingħata jekk isir it-test dwar in-naqal miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ:

— kemm hu fil-fond in-naqal miġbur,

— id-dehra tan-naqal (bħal ikkulurita, imtajna, imnaqqla, jew imramla),

— il-konsistenza (eż. ramel aħrax, ramel fin, naqal u tafal),

— użin xott f'g/l tas-solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, il-konċentrazzjoni *TOC* jew it-telf fil-piż meta jinxtegħel bħala kejl tal-kontenut ta' materja organika,

— il-*pH*,

— l-ossiġnu jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis (obbligatorju biss jekk il-kundizzjonijiet fejn jeħtieġ l-ossiġnu mhumiex ovvji).

Kundizzjonijiet tat-test:

— dewmien bejn il-ġbir u l-użu fit-test tal-laboratorju, il-ħżin tal-kampjun u t-trattament minn qabel tal-kampjun, id-data ta' kif marru l-istudji,

— l-ammont ta' sustanza tat-test applikat, il-konċentrazzjoni tat-test u s-sustanza ta' referenza,

— il-metodu tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test inkluż kull użu ta' aġenti li jinħallu fl-ilma,

— il-volum tal-ilma tal-wiċċ użat u n-naqal (jekk intuża) u l-volum użat għall-kampjuni f'kull intervall għall-analiżi,

— deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata,

jekk m'għandhomx jinżammu kundizzjonijiet mudlama, informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet b' "dawl batut",

— informazzjoni dwar il-metodu(i) użat(i) biex ikunu stabbiliti l-kontrolli li ma fihomx mikroorganiżmi (eż. it-temperatura, il-ħin u n-numru ta' sterilizzazzjonijiet bi stim ta' pressjoni għolja),

— it-temperatura tal-inkubazzjoni,

— informazzjoni dwar tekniki analitiċi u l-metodu(i) użati għal kejl radjokemikali u għall-bilanċ tal-piż u l-kejl tal-faži tat-tqassim (jekk sar),

— numru ta' repetizzjonijiet tal-esperiment.

Riżultati:

— persentaġġi ta' rkuprar (ara sezzjoni 1.7.1),

— kemm għandhom jiġu mtennija u kemm huma sensittivi l-metodi analitiċi użati inkluż il-limitu ta' sejbien (*LOD*) u l-limitu ta' kwantifikazzjoni (*LOQ*) (ara sezzjoni 1.7.2),

▼M1

— id-data kollha mkejla (inkluż il-punti tal-ħin tat-teħid tal-kampjuni) u l-valuri kkalkulati f'forma ta' tabelli u l-kurvi tad-diżintegrazzjoni; għal kull konċentrazzjoni tat-test u għal kull flixkun irrepetut għall-esperiment, irrapporta l-ko-effiċjent tal-korrelazzjoni lineari għan-niżla tal-plot logaritmiku, il-fażi tad-dewmien stmata u r-rata kostanti tal-ewwel ordni jew li tixxiebah (jekk jista' jkun), u d-diżintegrazzjoni nofs ħajja korrispondenti (jew il-perjodu nofs ħajja, t_{50}),

— irrapporta l-valuri relevanti bħala medji tar-riżultati osservati fir-repetizzjonijiet individwali tal-esperimenti, eż. it-tul tal-fazi tad-dewmien, ir-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni u d-diżintegrazzjoni nofs ħajja (jew t_{50}),

— qiegħed f'kategoriji s-sistema jew bħala mhux addattata jew addattata kif ġudikati mid-dehra tal-kurva tad-diżintegrazzjoni u mill-influwenza li jista' jkun hemm tal-konċentrazzjoni tat-test,

— ir-riżultati tal-verifika tal-bilanċ tal-piż finali u r-riżultati fuq il-kejl tal-fażi tat-tqassim (jekk hemm),

— il-frazzjoni ta' ^{14}C mineralizzat u, jekk jintużaw analiżi speċifiċi, il-livell finali tad-diżintegrazzjoni primarja,

— l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni tal-konċentrazzjoni *molar* u l-persentaġġ tal-prodotti applikati u maġġuri ta' trasformazzjoni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5), fejn jixraq,

— mogħdija proposta tat-trasformazzjoni, fejn jixraq,

— diskussjoni tar-riżultati.

4. **LETTERATURA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Il-kwalità tal-ilma — Evalwazzjoni tal-bijodegrabbiltà li teħtieġ l-ossiġnu tal-*compounds* organiċi b'konċentrazzjonijiet baxxi — Parti 1: Ħawwad il-flixkun tat-test tal-grupp li fih ilma tal-wiċċ jew ilma tal-wiċċ/naqal miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

3. Metodu tat-Testjar C. 23. Trasformazzjoni tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma u li ma jeħtiġux ossiġnu fil-ħamrija.

4. Metodu tat-Testjar C.24. Trasformazzjoni tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu u li ma jeħtiġux l-ossiġnu biex jikbru fin-naqal akwatiku.

5. *OECD* (1993). Linji ta' gwida biex ikunu Ittestjati l-Kimiċi. *OECD*, Pariġi.

6. ISO 8245 (1999). Kwalità tal-ilma — Linji ta' gwida dwar l-għarfien tal-karbonju organiku totali (*TOC*) u karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*).

7. ISO 10634 (1995). Il-kwalità tal-ilma — Gwida biex jiġu ippreparati u trattati *compounds* organiċi li ma jinħallux malajr fl-ilma għal evalwazzjoni sussegwenti tal-bijodegradabbiltà tagħhom f'mezz li fih l-ilma.

8. Abbozz tal-*OECD* (2000). Dokument ta' Gwida dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli. Pubblikazzjonijiet dwar is-Saħħa u s-Sigurtà Ambjentali. Sensiela fuq l-Ittestjar u l-Evalwazzjoni. Nru 22 (biex ikun ippubblikat fis-sajf 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. u Alexander, M. (1984). Mudelli għall-movimenti tal-mineralizzazzjoni bil-varjabbli tal-konċentrazzjoni tas-sottostrata u d-densità tal-popolazzjoni Mikrobijoloġija Ambjentali Applikata 47, 394-401.

10. Ingerslev, F. u N. Nyholm. (2000). Test dwar it-tħawwid ta' flixkun biex ikunu magħrufa r-rati tal-bijodegradazzjoni tal-kimiċi msejħa ^{14}C b'konċentrazzjonijiet baxxi fis-sistemi ta' l-ilma tal-wiċċ. Sigurtà Ambjentali Ekotossika 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Rapport tat-test tar-*ring*: Kwalità tal-Ilma — Evalwazzjoni tal-bijodegradabbiltà tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu fil-wiċċ tal-ilma tal-*compounds* organiċi b'konċentrazzjonijiet baxxi parti 1 — rapport tat-test tar-*ring* 1998/1999. Ħawwad il-flixkun tal-grupp tat-test li fih l-ilma tal-wiċċ jew l-ilma tal-wiċċ/naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

▼M1

Anness 1

Fażi tat-tqassim tal-^{14}C

Sabiex tiċċekkja l-proċedura, il-kejl tas-soltu tal-attività ^{14}C organika totali li jifdal wara l-evaporazzjoni (*TOA*) għandha tkun miżjuda bil-kejl tal-bilanċ tal-piż li jinvolvi għarfien dirett tal-$^{14}C_2$ evoluta wara li tinqabad f'assorbitur (ara Anness 3). Fiha nnifsha, formazzjoni pożittiva $^{14}CO_2$ hi evidenza diretta tal-bijodegradazzjoni kuntrarjament għad-diżintegrazzjoni mhux ħajja, jew mekkaniżmi oħra ta' telf, bħall-evaporazzjoni mgħaġġla u s-*sorption*. Informazzjoni oħra utli li tikkaratterizza l-imġiba tal-bijodegradabbiltà tista' tinkiseb mill-kejl tat-tqassim tat-*TOA* bejn l-istat maħlul fl-ilma (attività organika ^{14}C maħlula fl-ilma, *DOA*) u l-istat tal-partikuli separati (attività organika ^{14}C tal-partikuli separati, *POA*) wara l-firda tal-partikuli separati permezz ta' filtrar tal-membrana jew ta' proċess b'magna ta' ċentrifuga. Il-*POA* hu magħmul mis-sustanza tat-test *sorbed* fuq il-piż totali tal-mikroorganiżmi u fuq partikuli oħra barra mill-karbonju tas-sustanza tat-test li ntużaw għas-sinteżi tal-materjal ġdid ċellulari u riżultat t'ħekk inkorporti fil-frazzjoni tal-piż totali tal-partikuli separati tal-mikroorganiżmi. L-iffurmar ta' materjal organiku ^{14}C maħlul fl-ilma jista' jkun stmat bħala *DOA* fl-aħħar tal-bijodegradazzjoni (art għolja fuq id-diżintegrazzjoni kontra l-kurva tal-ħin).

Ħu stima tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni f'kampjuni magħżula bl-iffiltrar tal-kampjuni fuq 0,22 μm jew 0,45 μm jew filter tal-membrana ta' materjal li ma jżommx fil-wiċċ ammonti sinifikanti tas-sustanza tat-test (filters *polycarbonate* jistgħu jkunu addattati). Jekk is-*sorption* tas-sustanza tat-test fuq il-filter hi kbira wisq biex tkun injorata (biex tiġi iċċekjata qabel l-esperiment) jista' jintuża' proċess b'magna ta' ċentrifuga (2 000 g, 10 min) minflok l-iffiltrar.

Ipproċedi bil-likwidu ffiltrat jew is-solidu mifrud mil-likwidu kif deskritt fl-Anness 3 għal kampjuni mhux iffiltrati. Ħoll il-filters tal-membrana fi fluwidu florexxenti addattat u għodd bħas-soltu, normalment billi tuża' biss il-metodu tal-proporzjon tal-istandards esterni biex titnaqqas l-illuminazzjoni, jew uża kampjun li jitħallat ma' l-ossiġnu. Jekk intuża l-proċess b'magna ta' ċentrifuga, erġa' ssospendi l-ballun żgħir iffurmat minn frazzjoni ta' partikuli separati f'1-2 ml ta' ilma distillat u ttrasferrixxih għal kontenitur żgħir tal-mediċini li hu florexxenti. Aħsel sussegwentement darbtejn b'1ml ilma distillat u ittrasferixxi l-ilma tal-ħasil għall-kontenitur żgħir tal-mediċini. Jekk hemm bżonn, is-sospensjoni tista' ssir f'ġel li jgħodd il-florexxenza tal-likwidu.

▼M1

Anness 2

proċedura semi-kontinwa

Tista' tkun meħtieġa l-inkubazzjoni fit-tul għal diversi xhur sabiex tintlaħaq diżintegrazzjoni suffiċjenti tas-sustanzi li ma jobdux. It-tul tat-test m'għandux jaqbeż normalment is-60 ġurnata sakemm il-karatteristiċi tal-kampjun tal-ilma oriġinali ma jinżammux permezz ta' tiġdid tat-test ta' sospensjoni. Madankollu, il-perjodu tat-test jista' jkun estiż għal massimu ta' 90 jum mingħajr tiġdid tas-sospensjoni tat-test, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test bdiet fl-ewwel 60 ġurnata.

Waqt l-inkubazzjoni għal perjodi twal, id-diversità tal-komunità tal-mikroorganiżmi tista' titnaqqas minħabba mekkaniżmi diversi ta' telf u minħabba l-qerda possibbli tal-kampjun tal-ilma ta' nutrijenti essenzjali u sottostrati primarji tal-karbonju. Hu għalhekk irrikmandat li jintuża test semi-kontinwu biex tkun determinata biżżejjed ir-rata ta' diżintegrazzjoni tas-sustanzi li jiddiżintegraw bil-mod. It-test għandu jinbeda permezz ta' proċedura semi-kontinwa jekk, skont esperjenza mgħoddija, hu mistenni li jkun meħtieġ perjodu ta' inkubazzjoni ta' tliet xhur biex tinkiseb 20 % diżintegrazzjoni tas-sustanza. Inkella, it-test normali tal-grupp jista' jinbidel f'wieħed semi-kontinwu, jekk ma tkunx inkisbet diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test waqt madwar 60 ġurnata ta' testjar bl-użu tal-proċedura tal-grupp. Il-proċedura semi-kontinwa tista' titwaqqaf u t-test jitkompla bħala esperiment tal-grupp, meta tkun ġiet irrekordjata diżintegrazzjoni sostanzjali (eż. > 20 %).

Fit-test semi-kontinwu, kull ġimagħtejn, madwar terz tal-volum tat-test tas-sospensjoni jiġi mibdul b'ilma frisk miġbur bis-sustanza tat-test miżjuda mal-konċentrazzjoni tal-bidu. In-naqal jiġi miżjud bl-istess mod ma' l-ilma mibdul mal-konċentrazzjoni tal-bidu (bejn 0,01 u 1 g/l), jekk isir it-test sospiż tan-naqal mhux obbligatorju. Meta jsir it-test mas-solidi tan-naqal miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, hu importanti li s-sistema sospiża kollha tinżamm anki waqt li jitneħħa l-ilma, u l-ħin residenti jkun identiku għas-solidi u l-ilma, għax inkella x-xebħ maħsub ma' sistema uniformi akwatika bl-ebda fażijiet fissi tista' tintilef. Għal dawn ir-raġunijiet, konċentrazzjoni inizjali tan-naqal miżmum bejn il-qiegħ u l-wiċċ fil-medda t'isfel tal-intervall speċifikat hi preferuta, meta tintuża l-proċedura semi-kontinwa.

Iż-żieda preskritta tas-sustanza tat-test tfisser li l-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza tat-test ma tiġix maqbuża bit-tiġdid parzjali tat-test ta' sospensjoni u, għalhekk, l-addattament, li hu ta' spiss meqjus b'konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, ikun evitat. Peress li l-proċedura tikkonsisti minn dħul mill-ġdid tal-organiżmi u kumpens tan-nutrijenti meqruda u s-sottostrati primarji, id-diversità oriġinali tal-mikroorganiżmi terġa' tingħab għal li kienet, u t-tul tat-test jista' jkun estiż għal dejjem fil-prinċipju. Meta tintuża' l-istess proċedura semi-kontinwa, hu importanti li wieħed jinnota l-konċentrazzjoni li jifdal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tiġi korretta għall-ammonti tas-sustanza tat-test miżjuda u mneħħija f'kull proċedura ta' tiġdid. It-total u l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test maħlula fl-ilma tista' tintuża' b'mod alternat għall-*compounds* li jiffurmaw lura ftit. Il-formazzjoni lura hi insinifikanti (< 5 %) taħt il-kundizzjonijiet speċifikati (0,1-1g solidi/l) għas-sustanzi ta' *log Kow* < 3 (validi għall-*compounds* newtrali *lipophilic*). Dan jidher permezz tal-eżempju ta' kalkolazzjoni li ġej. 0,1 g/l ta' solidi bejn wieħed u ieħor jikkorrispondu għal 10 mg ta' karbonju kull litru (frazzjoni ta' karbonju, $f_C = 0.01$). Billi nassumu li;

Log K_{ow} (tas-sustanza tat-test) = 3

$K_{oc} = 0.42 \times K_{ow}$

Koeffiċjent ta' partizzjoni, $K_d = f_C \times K_{oc}$

imbagħad, il-frazzjoni maħlula fl-ilma tal-konċentrazzjoni totali (C-ilma (C_w)/C-totali (C_t) hija:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Anness 3

Kif jiġi determinat il-$^{14}CO_2$

Għarfien indirett tal-$^{14}CO_2$

Għall-kejl tas-soltu, il-metodu indirett huwa normalment l-inqas wieħed li jieħu ħin u l-aktar metodu preċiż jekk is-sustanza tat-test ma tevaporax malajr u ma tkunx trasformata f'prodotti tat-trasformazzjoni li jevaporaw malajr. Trasferiment sempliċi tal-kampjuni mhux iffiltrati eż. daqs ta' 5 ml f'kontenituri żgħar florexxenti użati għall-mediċina. Attività addattata fil-kampjuni hija5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq) fil-bidu, u attività minima inizjali hi madwar 1 000 dpm. Is-CO_2 għandu jitneħħa wara li jinkesa bl-aċtu għal pH 2-3 b'1-2 qatriet ta' H_3PO_4 ikkonċentrat jew *HC1*. It-tneħħija tas-CO_2 tista' ssir billi jiddaħħlu bżieżaq tal-arja għal nofs siegħa — siegħa. Inkella, il-kontenituri ż-żgħar użati għall-mediċina jistgħu jiġu mħawda bis-saħħa għal siegħa — sagħtejn (per eżempju fuq *microplate shaker*) jew b'tħawwid aktar ġentili li jitħalla bil-lejl. L-effiċjenza tal-proċedura tat-tneħħija tas-CO_2 għandha tkun iċċekkjata (billi jittawwal il-perjodu ta' l-iċċarġjar bil-gass jew tat-tħawwid). Likwidu florexxenti, addattat biex jiġu magħduda l-kampjuni akwatiċi għandu mbagħad jiġi miżjud, il-kampjuni uniformi fuq mikser li jdur u r-radjoattività magħrufa permezz tal-għadd tal-likwidu florexxenti, titnaqqas l-attività tal-isfond misjub fit-testijiet vojta (F_B). Sakemm l-ilma tat-test ma jkunx ikkulurit ħafna jew ikun fih konċentrazzjoni għolja tal-partikuli, il-kampjuni normalment juru florexxenza uniformi u se jkun biżżejjed biex jitnaqqsu l-korrezzjonijiet bl-użu ta' standard estern. Jekk l-ilma tat-test hu ikkulurit ħafna, jista' jkun hemm bżonn li titnaqqas il-korrezzjoni permezz ta' żjieda ta' standard intern. Jekk il-konċentrazzjoni tal-partikuli hi għolja jista' ma jkunx possibbli biex tinkiseb taħlita jew ġel uniformi, jew il-varjazzjoni fit-tnaqqis bejn il-kampjuni tista' tkun kbira. F'dak il-każ il-metodu tal-għadd deskritt hawn taħt għat-test tat-taħlitiet ta' semi-likwidi jista' jintuża. Jekk it-test isir bħala test tan-naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, il-kejl tal-$^{14}CO_2$ jista' jsir indirettament billi jittieħed kampjun uniformi ta' 10 ml tal-ilma tat-test/sospensjoni tat-test u jinfirdu l-fażijiet permezz ta' proċess b'magna ta' ċentrifuga b'veloċità addattata (eż. b'40 000 m/s^2 għal 15-il min.) Il-fażi akwatika għandha mbagħad tkun trattata kif deskritt hawn fuq. L-attività ^{14}C fil-fażi tal-partikuli separati (*POA*) għandha tkun determinata billi n-naqal jerġa' jiġi miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ f'volum żgħir ta' ilma distillat, billi jiġi trasferit f'kontenituri żgħar florexxenti użati għall-mediċina, u billi jiżdied il-likwidu florexxenti ħalli jifforma ġel (jeżistu likwidi speċjali florexxenti għal dan il-għan). Skont in-natura tal-partikuli (eż. kemm fihom materjal organiku), jista' jkun jaqbel li l-kampjun jiġi diġerit bil-lejl b'*solubiliser* tat-*tissue* u mbagħad jiġi uniformi fuq mikser li jdur qabel ma jiżdied il-likwidu florexxenti. Inkella, il-*POA* tista' tinstab permezz ta' kombustjoni mill-ossiġnu bl-użu ta' dak li jħallat ma' l-ossiġnu l-kampjun. Meta tkun qed tgħodd, l-istandards interni għandhom dejjem ikunu inklużi, u jista' jkun hemm bżonn li jsiru t-tiswijiet tat-tnaqqis billi jiżdied standard intern għal kull kampjun individwali.

Għarfien dirett tal-$^{14}CO_2$

Jekk il-$^{14}CO_2$ evoluta titkejjel direttament, għandha ssir billi jiġu preparati aktar fliexken fil-bidu tat-test, jiġu pproċessati l-fliexken tat-test f'kull punt tal-kejl billi l-fliexken tat-test jimtlew bl-aċtu għal pH 2-3 u jinġabar il-$^{14}CO_2$ f'assorbitur intern (imqiegħed f'kull flixkun fil-bidu tat-test) jew estern. Bħala mezz li jassorbi jista' jintuża' jew l-*alkali* (eż. taħlita *1 N NaOH*, jew *NaOH pellet*), *ethanolamine* jew ibbażata fuq l-*ethanolamine*. Għall-kejl dirett tal-$^{14}CO_2$, il-fliexken għandhom ikunu magħluqa per eżempju bl-għeluq tal-lastku sintetiku.

▼**M1**

Figura 1a

Eżempju ta' plot aritmetiku tad-data (l-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni kontra l-ħin

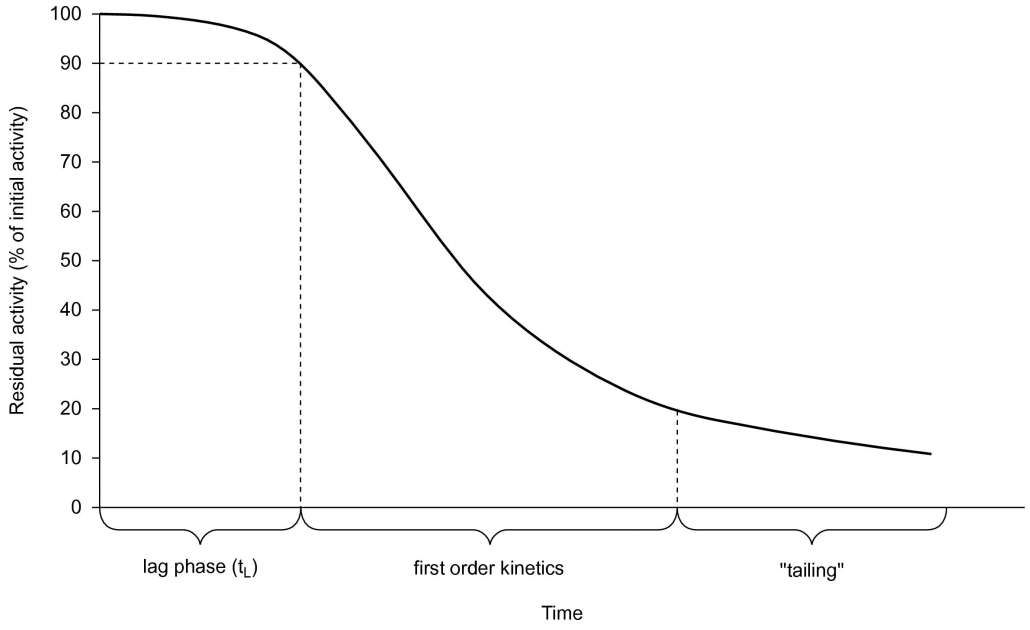
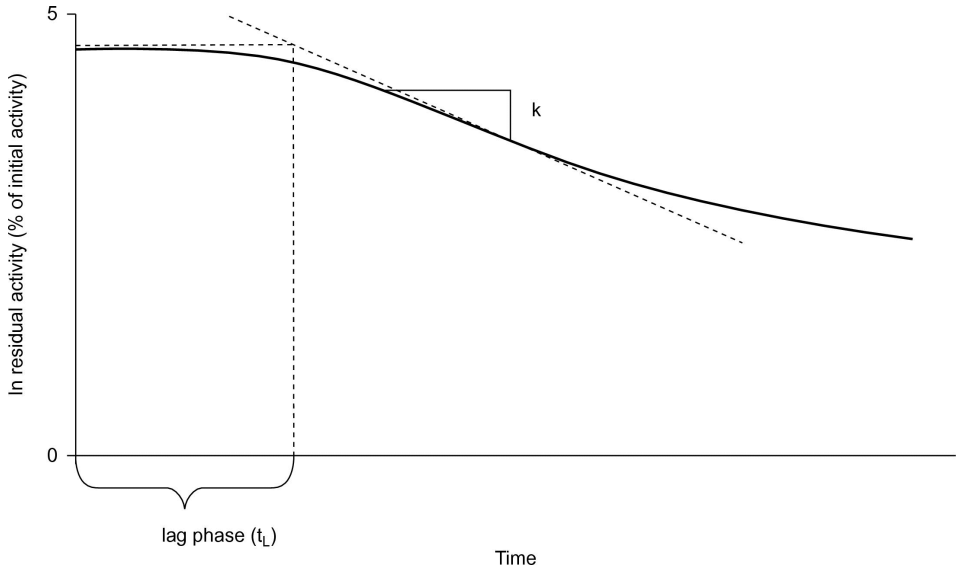


Figura 1b

Eżempju ta' plot semi-logaritmika (ln għall-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni kontra l-ħin).



▼M6

C.26. TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR TAL-ISPEĊI LEMNA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 221 tal-OECD (2006). Huwa maħsub biex jivvaluta t-tossiċità tas-sustanzi kimiċi lill-pjanti akkwatiċi tal-ilma ħelu tal-ġeneru *Lemna* (duckweed). Huwa bbażat fuq il-metodi eżistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6) iżda jinkludi modifikazzjonijiet ta' dawn il-metodi biex tiġi riflessa r-riċerka riċenti u l-konsultazzjoni fuq għadd ta' kwistjonijiet ewlenin. Dan il-Metodu ta' Ttestjar ġie vvalidat minn ring test internazzjonali (7).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi l-ittestjar tat-tossiċità permezz ta' *Lemna gibba* u *Lemna minor*, li t-tnejn intużaw b'mod estensiv u huma s-suġġett tal-istandards imsemmija hawn fuq. It-tassonomija ta' *Lemna* spp. hija diffiċili, peress li hija kkumplikata bl-eżistenza ta' firxa wiesgħa ta' fenotipi. Għalkemm tista' sseħħ varjabbiltà ġenetika fir-rispons għat-tossikanti b'*Lemna*, bħalissa hemm dejta insuffiċjenti dwar dan is-sors ta' varjabbiltà biex jiġi rakkomandat klonu speċifiku għall-użu ma' dan il-metodu ta' ttestjar. Ta' min jinnota li t-test ma jitwettaqx b'mod akseniku, iżda jittieħdu passi fi stadji matul il-proċedura tal-ittestjar biex il-kontaminazzjoni minn organiżmi oħra tinżamm kemm jista' jkun baxxa.

3. Huma deskritti d-dettalji tal-ittestjar b'tiġdid (semistatiku u bi fluss kontinwu) u mingħajr tiġdid (statiku) tas-soluzzjoni tat-test. Skont l-objettivi tal-ittestjar u r-rekwiżiti regolatorji, huwa rakkomandat li tiġi kkunsidrata l-applikazzjoni ta' metodi semistatiċi u bi fluss kontinwu, eż. għal sustanzi kimiċi li jintilfu rapidament minn soluzzjoni bħala riżultat ta' volatilizzazzjoni, fotodegradazzjoni, preċipitazzjoni jew bijodegradazzjoni. F'(8) tingħata gwida ulterjuri.

4. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAL-ITTESTJAR

5. Kulturi ta' pjanti li jikbru b'mod esponenzjali tal-ġeneru *Lemna* jistgħu jikbru bħala monokulturi f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test f'perjodu ta' sebat ijiem. L-objettiv tal-ittestjar huwa li jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi fuq it-tkabbir veġettativ matul dan il-perjodu abbażi ta' valutazzjonijiet tal-varjabbli ta' kejl magħżula. L-għadd ta' frondi huwa l-varjabbli ta' kejl primarju. Tal-inqas jitkejjel ukoll varjabbli ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk), peress li xi sustanzi kimiċi jistgħu jaffettwaw varjabbli ta' kejl oħra ħafna iktar mill-għadd ta' frondi. Biex jiġu kkwantifikati l-effetti relatati mas-sustanza, it-tkabbir fis-soluzzjonijiet tat-test huwa mqabbel ma' dak tal-kontrolli u l-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala l-EC_x (eż. EC_{50})

6. Dan il-punt ta' tmiem tat-test huwa l-inibizzjoni tat-tkabbir, espress bħala ż-żieda logaritmika fil-varjabbli ta' kejl (rata ta' tkabbir speċifika medja) matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Mir-rati medji ta' tkabbir speċifiku rreġistrati f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala l-E_rC_x (eż. E_rC_{50}).

7. Rispons varjabbli addizzjonali li jintuża f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa r-rendiment, li jista' jkun meħtieġ sabiex jiġu ssodisfati rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'xi pajjiżi. Huwa ddefinit bħala l-varjabbli ta' kejl fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni li minnu jitneħħa l-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni. Mill-prodott reġistrat f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni ġġib magħha x % speċifikat ta' rata ta' inibizzjoni ta' prodott (eż. 50 %) determinata u espressa bħala l-E_yC_x (eż. E_yC_{50}).

▼M6

8. Barra minn hekk, jistgħu jiġu stabbiliti statistikament il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

9. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku, b'sensittività adegwata għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fil-midjum tat-test.

10. Informazzjoni fuq is-sustanza kimika tat-test li tista' tkun utli biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula strutturali, purità, solubilità tal-ilma, stabbiltà fl-ilma u dawl, pK_a, K_{ow}, pressjoni tal-fwar u bijodegradabilità. Is-solubbiltà fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-kostanti ta' Henry's Law, li sejrin jindikaw jekk huwiex probabbli telf sinifikanti fis-sustanza kimika tat-test matul il-perjodu tal-ittestjar. Dan sejjer jgħin biex jindika jekk għandhomx jittieħdu passi partikolari biex jiġi kkontrollat tali telf. Fejn l-informazzjoni dwar is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test mhijiex ċerta, huwa rakkomandat li dawn jiġu vvalutati fil-kundizzjonijiet tat-test, jiġifieri l-midjum tat-tkabbir, it-temperatura, ir-reġim tad-dawl li għandhom jintużaw fit-test.

11. Meta l-kontroll tal-pH tal-midjum tat-test ikun partikolarment importanti, eż. meta l-metalli jew is-sustanzi kimiċi tat-test li huma idrolitikament instabbli, hija rakkomandata żieda ta' bafer mal-midjum tat-tkabbir (ara paragrafu 21). Hija pprovduta gwida ulterjuri għas-sustanzi kimiċi tat-test bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluhom diffiċli biex jiġu ttestjati fi (8).

VALIDITÀ TAT-TEST

12. Biex it-test ikun validu, iż-żmien tal-irdoppjar tal-għadd ta' frondi fil-kontroll għandu jkun inqas minn 2,5 jiem (60 siegħa), li jikkorrispondu għal żieda ta' bejn wieħed u ieħor seba' darbiet f'sebat ijiem u rata ta' tkabbir speċifika medja ta' 0,275 d^{-1}. Permezz tal-midjums u l-kundizzjonijiet tat-test deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, dan il-kriterju jista' jinkiseb permezz ta' reġim tal-ittestjar statiku (5). Huwa antiċipat ukoll li dan il-kriterju sejjer jintlaħaq f'kundizzjonijiet tat-test semistatiċi u bi fluss kontinwu. Il-kalkolu tal-ħin għall-irdoppjar huwa indikat fil-paragrafu 49.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

13. Is-sustanza (sustanzi) ta' referenza bħal 3,5-diklorofenol użata fir-ring test internazzjonali (7), tista' tiġi ttestjata bħala mezz ta' verifikar tal-proċedura tat-test. Huwa rakkomandat li tiġi ttestjata sustanza kimika ta' referenza tal-inqas darbtejn f'sena jew, fejn jitwettaq ittestjar bi frekwenza inqas, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

14. It-tagħmir kollu f'kuntatt mal-midjums tat-test għandu jkun magħmul mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. L-oġġetti tal-ħġieġ li jintużaw għal finijiet ta' kulturi u ttestjar għandhom jitnaddfu minn kontaminanti kimiċi li jistgħu jinfiltraw fil-midjum tat-test u għandhom ikunu sterili. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu wisgħin biżżejjed għall-frondi ta' kolonji differenti fir-reċipjenti ta' kontroll biex jikbru mingħajr ma jikkoinċidu fi tmiem it-test. Ma tagħmilx differenza jekk l-għeruq imissx mal-qigħan tar-reċipjenti tat-test, iżda huwa rakkomandat fond minimu ta' 20 mm u volum

▼M6

minimu ta' 100 mL f'kull reċipjent tat-test. L-għażla tar-reċipjenti tat-test mhijiex kritika sakemm jiġu sodisfatti dawn ir-rekwiżiti. Il-bekkijiet tal-ħġieġ, id-dixxijiet kristalizzanti jew id-dixxijiet tal-ħġieġ petri b'dimensjonijiet xierqa kollha rriżultaw adegwati. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitgħattew biex titnaqqas l-evaporazzjoni u l-kontaminazzjoni aċċidentali, filwaqt li jippermettu l-bdil tal-arja meħtieġ. Reċipjenti tal-ittestjar xierqa, u b'mod partikolari l-għotjien, għandhom jevitaw id-dell jew bidliet fil-karatteristiċi spettrali tad-dawl.

15. Il-kulturi u r-reċipjenti tat-test ma għandhomx jinżammu flimkien. Dan jintlaħaq bl-aħjar mod permezz ta' kompartimenti, inkubaturi, jew kmamar ta' tkabbir ambjentali separati. L-illuminazzjoni u t-temperatura għandhom ikunu kontrollabbli u miżmuma f'livell kostanti (ara l-paragrafi 35-36).

Organiżmu tat-test

16. L-organiżmu użat għal dan it-test huwa *Lemna gibba* jew *Lemna minor*. Fl-Appendiċi 2 jingħataw deskrizzjonijiet fil-qosor tal-ispeċijiet ta' duckweed li ntużaw għall-ittestjar tat-tossiċità. Il-materjal tal-pjanti jista' jinkiseb minn ġabra tal-kultura, laboratorju ieħor jew minn fuq il-post. Jekk jinġabru minn fuq il-post, l-impjanti għandhom jinżammu f'kultura fl-istess midjum kif użat għall-ittestjar għal minimu ta' tmien ġimgħat qabel l-użu. Is-siti tal-oqsma użati għall-ġbir tal-kulturi tal-bidu għandhom ikunu mingħajr sorsi ovvji ta' kontaminazzjoni. Jekk jinkisbu minn laboratorju jew ġbir ta' kultura ieħor, għandhom jinżammu bl-istess mod għal minimu ta' tliet ġimgħat. Is-sors tal-materjal tal-pjanti l-ispeċi u l-klonu (jekk ikunu magħrufa) użati għall-ittestjar għandhom dejjem jiġu rrapportati.

17. Għandhom jintużaw monokulturi, li huma viżibbilment mingħajr kontaminazzjoni minn organiżmi oħra bħal algi u protozoa. Pjanti b'saħħithom ta' *L. minor* sejrin jikkonsistu minn kolonji li jinkludu bejn żewġ frondi u ħamsa filwaqt li kolonji b'saħħithom ta' *L. gibba* jista' jkun fihom sa seba' frondi.

18. Il-kwalità u l-unformità tal-pjanti użati għall-ittestjar sejjer ikollhom influwenza sinifikanti fuq l-eżitu tal-ittestjar u għandhom għalhekk jintgħażlu b'attenzjoni. Għandhom jintużaw pjanti żgħar li jikbru rapidament mingħajr leżjonijiet jew diskolorazzjoni (klorożi) evidenti. Kulturi ta' kwalità tajba huma indikati minn inċidenza għolja ta' kolonji li jinkludu tal-inqas żewġ frondi. Numru kbir ta' frondi uniċi huwa indikattiv ta' stress ambjentali, eż. limitazzjoni ta' nutrijenti, u ma għandux jintuża materjal ta' pjanti minn tali kulturi għall-ittestjar.

Kultivazzjoni

19. Biex titnaqqas il-frekwenza taż-żamma tal-kultura (eż. meta jkunu ppjanati testjiet ta' *Lemna* għal perjodu), il-kulturi jistgħu jinżammu f'illuminazzjoni u temperatura mnaqqsin (4 — 10 °C). Dettalji tal-kulturi jingħataw fl-Appendiċi 3. Sinjali ovvji ta' kontaminazzjoni minn algi jew organiżmi oħra jaf ikunu jeħtieġu sterilizzazzjoni tal-wiċċ ta' sottokampjun ta' frondi ta' *Lemna,* segwita minn trasferiment għal midjum ġdid (ara l-Appendiċi 3). F'din l-eventwalità, il-kultura kontaminata li jifdal għandha tintrema.

20. Tal-inqas sebat ijiem qabel l-ittestjar, biżżejjed kolonji jiġu ttrasferiti b'mod asettiku f'midjum sterili ġdid u kkulturati għal 7 — 10 ijiem f'kundizzjonijiet tat-test.

Midjum tat-test

21. Huma rakkomandati midjums differenti għal *Lemna minor* u *Lemna gibba*, kif deskritt hawn taħt. Għandha tingħata kunsiderazzjoni b'attenzjoni ta' bafer ta' pH fil-midjum tat-test (MOPS (aċidu sulfoniku ta' 4-morfolinapropan, Nru CAS: 1132-61-2) fil-midjum *L. minor* u $NaHCO_3$ fil-midjum *L. gibba*) meta jkun suspettat li dan jista' jkollu reazzjoni mas-sustanza kimika tat-test u jinfluwenza l-espressjoni tat-tossiċità tagħha. Il-Midjum ta' Steinberg (9) huwa aċċettabbli wkoll sakemm jiġu sodisfatti l-kriterji ta' validità.

▼M6

22. Hija rakkomandata modifikazzjoni tal-midjum ta' tkabbir Lemna tal-istandard Svediż (SIS) għall-kulturi u l-ittestjar b'L. minor. Fl-Appendiċi 4 tingħata l-kompożizzjoni ta' dan il-midjum.

23. Huwa rakkomandat il-midjum tat-tkabbir, 20X — AAP, kif deskritt fl-Appendiċi 4, għall-kulturi u l-ittestjar b'*L. gibba*.

24. Il-midjum Steinberg, kif deskritt fl-Appendiċi 4, huwa xieraq ukoll għal *L. minor*, iżda jista' jintuża wkoll għal *L. gibba* sakemm jiġu sodisfatti l-kriterji ta' validità.

Soluzzjonijiet tal-ittestjar

25. Is-soluzzjonjiet tal-ittestjar, ġeneralment jiġu ppreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza kimika tat-test normalment jiġu ppreparati billi tinħall is-sustanza kimika fil-midjum tat-tkabbir.

26. Il-konċentrazzjoni l-iktar ogħla ttestjata tas-sustanza kimika tat-test ma għandhiex normalment taqbeż is-solubbiltà fl-ilma tas-sustanza kimika f'kundizzjonijiet tat-test. Madankollu għandu jiġi nnotat li *Lemna* spp. jżommu f'wiċċ l-ilma u jaf ikunu esposti għal sustanzi kimiċi li jinġabru bejn l-ilma u l-arja (eż. sustanzi kimiċi li ma tantx jinħallu fl-ilma jew idrofobiċi jew sustanzi kimiċi tensjoattivi). F'tali ċirkostanzi, sejjer ikun hemm espożizzjoni mill-materjal minbarra fis-soluzzjoni u l-konċentrazzjonijiet tat-test jistgħu, skont il-karatteristiċi tas-sustanza kimika tat-test, jaqbżu, is-solubbiltà fl-ilma. Għas-sustanzi kimiċi tat-test ta' solubbiltà fl-ilma baxxa, jaf ikun meħtieġ li tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija kkonċentrata jew dispersjoni tas-sustanza kimika permezz ta' solvent organiku jew aġent dispersiv sabiex tiġi ffaċilitata ż-żieda ta' kwantitajiet preċiżi tas-sustanza kimika tat-test mal-midjum tat-test u tiġi megħjuna fid-dispersjoni u x-xoljiment tagħha. Għandu jsir kull sforz possibbli biex jiġi evitat l-użu ta' tali materjali. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossiċità li tirriżulta mill-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi awżiljarji. Pereżempju, solventi li jintużaw b'mod komuni li ma jikkawżawx fitotossiċità fil-konċentrazzjonijiet sa 100 µl//l jinkludu aċetun u dimetilformamid. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv, għandha tiġi rrapportata l-konċentrazzjoni finali tiegħu li għandha tinżamm kemm jista' jkun baxxa (≤ 100 µl/l), u t-trattamenti u l-kontrolli kollha għandu jkun fihom l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew aġent dispersiv. F'(8) ingħatat gwida ulterjuri dwar l-użu ta' aġenti dispersivi.

Gruppi tat-test u ta' kontroll

27. Għarfien minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għal *Lemna*, eż. minn test tas-sejba tal-medda, sejjer jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa. Fit-test finali tat-tossiċità, normalment għandu jkun hemm tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test irranġati f'serje ġeometrika. Preferibbilment il-fattur ta' separazzjoni bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test ma għandhomx ikunu ikbar minn 3,2, iżda jista' jintuża valur ikbar fejn il-kurva tal-konċentrazzjoni/rispons hija dritta. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet. Għandhon jintużaw tal-inqas tliet repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test.

28. Fl-istabbiliment tal-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (għas-sejba tal-medda u/jew għat-test finali tat-tossiċità), għandu jiġi kkunsidrat li ġej:

— Biex tiddetermina EC_x, il-konċentrazzjonijiet tat-test iridu jsostnu l-valur EC_x sabiex tiżgura livell ta' kunfidenza adegwat. Pereżempju, jekk tkun qed tikkalkula l-EC_{50}, l-iktar konċentrazzjoni għolja għandha tkun ikbar mill-valur tal-EC_{50}. Jekk il-valur EC_{50} jinstab barra l-firxa ta' konċentrazzjonijiet tat-test, intervalli ta' kunfidenza assoċjati jkunu kbar u valutazzjoni xierqa tal-fit statistiku tal-mudell tista' ma tkunx possibbli,

— Jekk l-għan huwa li jiġu stmati l-LOEC/NOEC, l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ma jkunx sinifikatament iktar baxx minn dak tal-kontroll. Barra minn hekk,

▼M6

l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ikun ferm inqas milli fil-kontroll. Jekk dan ma jkunx il-każ, it-test għandu jiġi ripetut permezz ta' medda ta' konċentrazzjoni differenti (sakemm l-ogħla konċentrazzjoni tkun fil-limitu tas-solubbiltà jew il-konċentrazzjoni limitu meħtieġa massima, eż. 100 mg/l).

29. Kull test għandu jinkludi kontrolli li jikkonsistu mill-istess midjum ta' nutrijenti, in-numru ta' frondi u kolonji, il-kundizzjonijiet ambjentali u l-proċeduri bħar-reċipjenti tat-test iżda mingħajr is-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv awżiljari, għandu jiġi inkluż trattament ta' kontroll addizzjonali bis-solvent/aġent dispersiv preżenti fl-istess konċentrazzjoni bħar-reċipjenti bis-sustanza kimika tat-test. In-numru ta' repliki tar-reċipjenti ta' kontroll (u r-reċipjenti tas-solventi, jekk ikun applikabbli) għandu tal-inqas ikun l-istess, u idealment darbtejn, in-numru ta' reċipjenti użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.

30. Jekk ma tkunx meħtieġa determinazzjoni tal-NOEC, id-disinn tal-ittestjar jista' jiġi mmodifikat biex jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. Madankollu, in-numru ta' repliki ta' kontroll għandu jkun tal-inqas tlieta.

Espożizzjoni

31. Kolonji li jikkonsistu minn 2 sa 4 frondi viżibbli huma ttrasferiti mill-kultura tal-inokulu u jiġu assenjati b'mod każwali għar-reċipjenti tat-test f'kundizzjonijiet asettiċi. Kull reċipjent tat-test għandu jkun fih total ta' 9 sa 12-il frond. In-numru ta' frondi u kolonji għandu jkun l-istess f'kull reċipjent tat-test. L-esperjenza miksuba b'dan il-metodu u d-dejta tar-ring test indikaw li l-użu ta' tliet repliki għal kull trattament, b'kull replikat li fil-bidu jkun fih 9 sa 12-il frond, huwa biżżejjed biex jiġu skoperti differenzi fit-tkabbir ta' madwar 4 sa 7 % tal-inibizzjoni kkalkolata mir-rata ta' tkabbir (10 sa 15 % ikkalkolata mir-rendiment) bejn it-trattamenti (7).

32. Huwa meħtieġ disinn aleatorju għal-lokazzjoni tar-reċipjenti tat-test fl-inkubatur biex titnaqqas l-influwenza tad-differenzi spazjali fl-intensità tad-dawl jew it-temperatura. Huma meħtieġ ukoll disinn ibblokkjat jew ripożizzjonament każwali tar-reċipjenti meta jsiru l-osservazzjonijiet (jew ripożizzjonament iktar frekwenti).

33. Jekk test tal-istabbiltà preliminari juri li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tistax tinżamm (jiġifieri l-konċentrazzjoni mkejla taqa' taħt it-80 % tal-konċentrazzjoni inizjali mkejla) matul id-durata tat-test (7 ijiem), huwa rakkomandat reġim tal-ittestjar semistatiku. F'dan il-każ, il-kolonji għandhom ikunu esposti għal testijiet li għadhom kif jiġu ppreparati u s-soluzzjonijiet ta' kontroll f'tal-anqas żewġ okkażjonijiet matul it-test (eż. il-jiem 3 u 5). Il-frekwenza ta' espożizzjoni għal midjum ġdid sejra tiddependi fuq l-istabbilità tas-sustanza kimika tat-test; frekwenza ogħla jaf tkun meħtieġa biex jinżammu konċentrazzjonijiet viċin għall-kostanti ta' sustanzi kimiċi volatili u mhux stabbli ħafna. F'xi ċirkostanzi, jaf tkun meħtieġa proċedura bi fluss kontinwu (8)(10).

34. Ix-xenarju ta' espożizzjoni permezz ta' applikatur tal-weraq (sprej) mhuwiex kopert f'dan il-metodu ta' ttestjar; minflok, ara (11).

Kundizzjonijiet tal-inkubazzjoni

35. Dawl kontinwu fluworexxenti sħun jew frisk għandu jintuża biex jipprovdi intensità tad-dawl magħżula minn għażla ta' 85-135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$ meta mkejjel f'radjazzjoni attiva fotosintetika (400-700 nm) f'punti fl-istess distanza mis-sors ta' dawl bħall-frondi Lemna (ekwivalenti għal 6 500-10 000 lux). Kwalunkwe differenza mill-intensità tad-dawl magħżula fl-erja tal-ittestjar

▼M6

ma għandhiex taqbeż il-medda ta' ± 15 %. Il-metodu ta' detezzjoni u kejl, b'mod partikolari t-tip ta' senser, sejjer jaffettwa l-valur imkejjel. Is-sensers sferiċi (li jirrispondu għad-dawl minn angoli 'l fuq u taħt il-pjan ta' kejl) u s-sensers "cosine" (li jirrispondu għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl) huma ppreferuti minn sensers unidirezzjonali, u ser jagħtu riżultati tal-qari ogħla, għal sors ta' dawl b'ħafna punti tat-tip deskritt hawnhekk.

36. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test għandha tkun ta' 24 ± 2 °C. Il-pH tal-midjum ta' kontroll ma għandux jiżdied b'aktar minn 1 5 unitajiet matul it-test. Madankollu, devjazzjoni ta' iktar minn 1,5 unità ma tinvalidax it-test meta jkun jista' jintwera li ġew sodisfatti l-kriterji ta' validità. Hija meħtieġa iktar attenzjoni f'każijiet speċjali bħal meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi mhux stabbli jew metalli. Ara (8) għal gwida ulterjuri.

Perjodu

37. It-test jintemm 7 ijiem wara li l-pjanti jiġu ttrasferiti fir-reċipjenti tat-test.

Kejliet u determinazzjonijiet analitiċi

38. Fil-bidu tat-test, jingħadd u jiġi rreġistrat in-numru ta' frondi fir-reċipjenti tat-test, filwaqt li jiġi żgurat li jittieħed kont tal-frondi viżibbli b'mod evidenti li jisporġu 'l barra. In-numru ta' frondi li jidher normali jew anormali, jeħtieġ li jiġi ddeterminat fil-bidu tat-test, tal-inqas darba kull 3 ijiem matul il-perjodu ta' espożizzjoni (jiġifieri tal-inqas 2 okkażjonijiet matul il-perjodu ta' 7 ijiem) u fi tmiem ti-test. Għandhom jiġu nnotati l-bidliet fl-iżvilupp tal-impjant, eż. d-daqs tal-frond, id-dehra, l-indikazzjoni ta' nekrożi, klorożi jew gibbożità, it-tifrik ta' kolonja jew it-telf taż-żamma fil-wiċċ, u fit-tul u d-dehra tal-għeruq. Għandhom jiġu nnotati wkoll karatteristiċi sinifikanti tal-midjum tat-test (eż. preżenza ta' materjal mhux maħlul, tkabbir ta' algi fir-reċipjenti tat-test).

39. Minbarra d-determinazzjoni tan-numru ta' frondi matul it-test, huma vvalutati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq wieħed (jew iktar) mill-varjabbli ta' kejl li ġejjin:

(i) erja totali tal-frond,

(ii) piż xott,

(iii) piż frisk.

40. L-erja totali tal-frondi għandha vantaġġ, li tista' tiġi ddeterminata għal kull reċipjent tat-test u ta' kontroll fil-bidu, matul u fi tmiem it-test. Fil-bidu tal-ittestjar għandu jiġi ddeterminat il-piż xott jew frisk minn kampjun tal-kultura tal-inokulu li jirrappreżenta x'jintuża fil-bidu tat-test, u fi tmiem l-ittestjar bil-materjal tal-impjant minn reċipjent tat-test u ta' kontroll. Jekk ma titkejjilx l-erja tal-frond, il-piż xott huwa ppreferut mill-piż frisk.

41. L-erja totali tal-frond, il-piż xott u l-piż frisk jistgħu jiġu ddeterminati kif ġej:

(i) *Erja totali tal-frond*: L-erja totali tal-frond tal-kolonji kollha tista' tiġi ddeterminata b'analiżi tal-immaġnijiet. Tista' tittieħed il-forma tar-reċipjent tat-test u l-pjanti permezz ta' kamera bil-vidjo (jiġifieri billi r-reċipjent jitqiegħed fuq kaxxa tad-dawl) u l-immaġni li tirriżulta tiġi diġitizzata. Bil-kalibrazzjoni b'forom ċatti ta' erja magħrufa, tista' tiġi ddeterminata l-erja totali tal-frond f'reċipjent tat-test. Wieħed għandu joqgħod attent biex jeskludi interferenza kkawżata mir-rimm tar-reċipjent tat-test. Approċċ alternattiv iżda iktar impenjattiv huwa li jiġu fotokopjati r-reċipjenti tat-test u l-pjanti, tinqata' l-forma li tirriżulta tal-kolonji u tiġi ddeterminata l-erja tagħhom permezz ta' analizzatur tal-erja tal-weraq jew karta tal-graffs. Jaf ikunu xierqa wkoll tekniki oħra (eż. il-proporzjon tal-piż tal-karta bejn l-erja tas-siluwett tal-kolonji u l-unità tal-erja).

▼**M6**

(ii) *Piż xott*: Il-kolonji kollha jinġabru minn kull wieħed mir-reċipjenti tat-test u jitlaħalħu b'ilma distillat jew dejonizzat. Dawn jiġu xxugati biex jitneħħa l-ilma żejjed u mbagħad jitnixxfu f'60 °C sa piż kostanti. Għandu jiġi inkluż kwalunkwe framment tal-għeruq. Il-piż xott għandu jiġi espress għal preċiżjoni ta' mill-anqas 0,1 mg.

(iii) *Piż frisk*: Il-kolonji kollha huma ttrasferiti għal tubi ta' polistiren (jew materjal inerti ieħor) li ntiżnu minn qabel b'toqob żgħar (1 mm) fil-qigħan tondi. Imbagħad it-tubi jiġu ċentrifugati f'3 000 rpm għal 10 minuti f'temperatura tal-ambjent. Tubi, li fihom kolonji li issa nixfu, jerġgħu jintiżnu u l-piż frisk jiġi kkalkolat billi jitnaqqas il-piż tat-tubu vojt.

Frekwenza tal-kejliet u d-determinazzjonijiet analitiċi

42. Jekk jintuża disinn ta' test statiku, għandha titkejjel il-pH ta' kull trattament fil-bidu u fi tmiem it-test. Jekk jintuża disinn tat-test semistatiku, il-pH għandha titkejjel f'kull lott ta' soluzzjoni tat-test "ġdid" qabel kull tiġdid u anki fis-soluzzjonijiet korrispondenti "użati".

43. L-intensità tad-dawl għandha titkejjel fil-kompartiment, l-inkubatur jew il-kamra tat-tkabbir f'punti li jinsabu fl-istess distanza mis-sors tad-dawl bħall-frondi *Lemna*. Il-kejliet għandhom isiru tal-inqas darba matul it-test. It-temperatura tal-midjum f'reċipjent surrogat miżmum fl-istess kundizzjonijiet fil-kompartiment tat-tkabbir, l-inkubatur jew il-kamra għandha tiġi rreġistrata tal-inqas kuljum.

44. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma ddeterminati f'intervalli xierqa. F'testijiet statiċi, ir-rekwiżit minimu huwa li jiġu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet fil-bidu u fi tmiem it-test.

45. F'testijiet semistatiċi li fihom il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx mistennija li tibqa' fi ħdan l-± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, huwa meħtieġ li jiġu analizzati s-soluzzjonijiet tat-test li għadhom kif jiġu ppreparati u l-istess soluzzjonijiet f'kull tiġdid (ara l-paragrafu 33). Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza kimika tat-test hija fi ħdan l-± 20 % tan-nominali iżda fejn tista' tingħata biżżejjed evidenza biex jintwera li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma repetibbli u stabbli (jiġifieri fi ħdan il-medda 80 — 120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitwettqu biss fuq l-ogħla jew l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test qabel it-tiġdid għandha ssir biss fuq reċipjent tar-replikat wieħed f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tar-reċipjenti miġbura mir-replikat).

46. Jekk jintuża test bi fluss kontinwu, reġim ta' kampjunar simili għal dak deskritt għat-testijiet semistatiċi, inkluż analiżi fil-bidu, fin-nofs u fit-tmiem it-test, huwa xieraq, iżda l-kejl ta' soluzzjonijiet użati mhuwiex xieraq f'dan il-każ. F'dan it-tip ta' test, ir-rata ta' fluss tad-dilwent u s-sustanza kimika tat-test jew is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ċċekkjati kuljum.

47. Jekk ikun hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li qiegħda tiġi ttestjata nżammet b'mod sodisfaċenti fi ħdan il-konċentrazzjoni ta' ± 20 % tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, l-analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla ma tkunx fi ħdan il-medda ta' ± 20 %, l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja ġeometrika matul l-espożizzjoni jew il-mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (8).

▼M6

Test tal-limitu

48. F'ċerti ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza kimika tat-test ma għandha ebda effetti tossiċi f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-midjum tat-test (irrispettivament minn liema huwa l-inqas), jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi tqabbil tar-risponsi fi grupp ta' kontroll u grupp ta' trattament partikolari (100 mg/l jew konċentrazzjoni daqs il-limitu ta' solubbiltà). Huwa rakkomandat ħafna li dan jiġi appoġġjat minn analiżi tal-konċentrazzjoni tal-espożizzjoni. Japplikaw il-kundizzjonijiet tat-test u l-kriterji ta' validità deskritti preċedentement kollha għal test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li n-numru ta' repliki tat-trattament għandhom jiġu dduplikati. It-tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-midjums, eż. Test-t ta' Student.

DEJTA U RAPPORTAR

Hin għall-irdoppjar

49. Biex jiġi ddeterminat il-ħin għall-irdoppjar *(T_d)* tan-numru ta' frondi u l-konformità ma' dan il-kriterju ta' validità mill-istudju (paragrafu 12), tintuża l-formola li ġejja b'dejta miksuba mir-reċipjenti ta' kontroll:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

fejn μ hija r-rata ta' tkabbir speċifika medja ddeterminata kif deskritt fil-paragrafi 54-55.

Varjabbli ta' rispons

50. Il-fini tat-test huwa li jiddetermina l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv ta' *Lemna.* Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiddeskrivi żewġ fatturi ta' rispons, peress li ġurisidizzjonijiet differenti għandhom preferenzi u ħtiġijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli fil-ġurisdizzjonijiet kollha, l-effetti għandhom jiġu evalwati permezz taż-żewġ varjabbli tar-rispons (a) u (b) deskritti hawn taħt.

(a) *Rata ta' tkabbir speċifika medja*: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat fuq il-bażi tal-bidliet fil-logaritmi tan-numru ta' frondi, u barra minn hekk, fuq il-bażi tal-bidliet fil-logaritmi ta' parametru ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) maż-żmien (espress għal kull jum) fil-kontrolli u kull grupp ta' trattament. Xi drabi jissejjaħ bħala r-rata ta' tkabbir relattiva (12).

(a) *Rendiment*: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat fuq il-bażi tal-bidliet fin-numru ta' frondi, u barra minn hekk, fuq il-bażi tal-bidliet fil-parametru ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament sa tmiem it-test.

51. Għandu jiġi nnotat li l-valuri tat-tossiċità kkalkolati permezz ta' dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma jistgħux jitqabblu u din id-differenza għandha tiġi rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) ikunu ġeneralment ogħla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-Metodu ta' ttestjar jiġu rrispettati, minħabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Dan ma għandux jiġi interpretat bħala d-differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, iżda sempliċement li li l-valuri huma matematikament differenti. Il-kunċett ta' rata ta' tkabbir speċifika medja huwa bbażat fuq il-mudell ta' tkabbir esponenzjali tad-duckweed f'kulturi mhux limitati, fejn it- tossiċità hija stmata abbażi tal-effetti fuq ir-rata ta' tkabbir, mingħajr ma tiddependi fuq il-livell assolut tar-rata ta' tkabbir speċifika tal-kontroll, il-pendil tal-kurva tal-konċentrazzjoni/rispons jew fuq id-durata tat-test. B'kuntrast, ir-riżultati bbażati fuq il-varjabbli tar-rispons tar-rendimentjiddependu fuq dawn il-varjabbli l-oħra kollha. E_yC_x hija dipendenti fuq ir-rata speċifika ta' tkabbir tal-ispeċje tad-duckweed użata fit-test u

▼M6

fuq ir-rata massima speċifika ta' tkabbir li tista' tvarja bejn speċi jew anki kloni differenti. Dan ir-rispons varjabblima għandux jintuża għat-tqabbil tas-sensittività għat-tossikanti fost l-ispeċijiet ta' duckweedjew anki kloni differenti. Filwaqt li l-użu tar-rata ta' tkabbir speċifika għall-istima tat-tossiċità hija xjentifikament ppreferuta, l-istimi tat-tossiċità ibbażati fuq ir-rendiment huma inklużi wkoll f'dan il-Metodu ta' Ttestjar biex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti regolatorji attwali f'xi ġurisdizzjonijiet.

52. L-istimi tat-tossiċità għandhom ikunu bbażati fuq in-numru ta' frondi u fuq varjabbli ta' kejl addizzjonali wieħed (erja totali tal-frond, piż xott jew piż frisk) peress li xi sustanzi kimiċi jistgħu jaffettwaw varjabbli ta' kejl oħra ħafna iktar min-numru ta' frondi. L-effett ma jiġix identifikat bil-kalkolu tan-numru ta' frondi biss.

53. In-numru ta' frondi, kif ukoll kwalunkwe varjabbli ta' kejl irreġistrat ieħor, jiġifieri l-erja totali tal-frondi, il-piż xott jew il-piż frisk, huma tabulati flimkien mal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għal kull okkażjoni ta' kejl. Analiżi tad-dejta sussegwenti eż. biex tikkalkula LOEC, NOEC jew EC_x għandhom ikunu bbażati fuq il-valuri għar-repliki individwali u mhux fuq medji kkalkulati għal kull grupp ta' trattament.

Rata ta' tkabbir speċifika medja

54. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għal perjodu speċifiku hija kkalkolata bħala ż-żieda logaritmika fil-varjabbli tat-tkabbir — in-numru tal-frondi u varjabbli ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) — permezz tal-formola ta' hawn taħt għal kull replikat ta' kontroll u t-trattamenti:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

fejn:

— μ_{i-j}: rata ta' tkabbir speċifika medja mill-ħin i sa j

— N_i: varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'ħin i

— N_j: varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'ħin j

— t: perjodu ta' ħin minn i sa j

Għal kull grupp ta' trattament u kull grupp ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza.

55. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għandha tiġi kkalkolata għall-perjodu ta' ttestjar kollu (il-ħin "i" fil-formola ta' hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-ħin "j" huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir speċifika medja flimkien mal-istimi tal-varjanza. Barra minn hekk, għandha tiġi vvalutata r-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni sabiex jiġu evalwati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test li jseħħu matul il-perjodu ta' espożizzjoni (eż. billi jiġu spezzjonati l-kurvi ta' tkabbir ittrasformati mil-log). Differenzi sostanzjali bejn ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni u r-rata ta' tkabbir medja jindikaw devjazzjoni minn tkabbir esponenzjali kostanti u li hija ggarantita eżaminazzjoni mill-qrib tal-kurvi ta' tkabbir. F'dan il-każ, approċċ konservattiv ikun li jitqabblu rati ta' tkabbir speċifiċi minn kulturi ttrattati matul il-perjodu tal-ħin tal-inibizzjoni massima għal dawk għall-kontrolli matul l-istess perjodu ta' żmien.

56. Persentaġġ ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir (I_r) jista' jiġi kkalkulat fuq kull konċentrazzjoni tat-test (grupp ta' trattament) bil-formula li ġejja:

▼M6

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

fejn:

— % I_r: inibizzjoni perċentwali fir-rata ta' tkabbir speċifika medja;

— μ_C: valur medju għal μ fil-kontroll

— μ_T: valur medju għal μ fil-grupp ta' trattament

Rendiment

57. L-effetti fuq ir-rendiment huma ddeterminati abbażi ta' żewġ varjabbli ta' kejl, in-numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl ieħor (erja totali tal-frond, piż xott jew piż frisk) preżenti f'kull reċipjent tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test. Għal piż xott jew piż frisk, il-bijomassa tal-bidu hija ddeterminata abbażi ta' kampjun tal-frondi meħud mill-istess lott użat biex jiġu inokulati r-reċipjenti tat-test (ara l-paragrafu 20). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rendiment flimkien mal-istimi tal-varjanza. L-inibizzjoni perċentwali medja fir-rendiment (%I_y) tista' tiġi kkalkolata għal kull grupp ta' trattament kif ġej:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

fejn:

— % I_y: tnaqqis perċentwali fir-rendiment

— b_C: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għall-grupp ta' kontroll

— b_T: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu fil-grupp ta' trattament

Ipplottjar tal-kurvi konċentrazzjoni rispons

58. Għandhom jiġu pplottjat kurvi konċentrazzjoni rispons relatati mal-inibizzjoni perċentwali tal-varjabbli ta' rispons (I_r, jew I_y ikkalkolati kif indikati fil-paragrafu 56 jew 57) u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tat-test.

Estimi ta' EC_x

59. Estimi ta' EC_x (eż. EC_{50}) għandhom dejjem ikunu bbażati kemm fuq ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) kif ukoll fuq ir-rendiment (E_yC_x), u t-tnejn li huma għandhom ikunu bbażati fuq l-għadd tal-frondi u varjabbli ieħor ta' kejl (erja totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk). Dan huwa minħabba li hemm sustanzi kimiċi tat-test li jaffettwaw in-numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl b'mod differenti. Il-parametri ta' tossiċità mixtieqa huma għalhekk erba' valuri EC_x għal kull livell ta' inibizzjoni kkalkulat: E_rC_x (numru ta' frond); E_rC_x (area totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk); E_yC_x (numru ta' frond); u E_yC_x (area totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk).

Proċeduri ta' statistika

60. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analiżi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ppeżata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-dejta dwar ir-rispons — eż. f'unitajiet probit jew logit jew Weibull (13), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli fid-dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet uniformi. Meta jkunu viċin iż-żero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistgħu jitkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analiżi (13). Għandu jiġi nnotat li metodi standard ta' analiżi permezz ta' trasformati ta' probit, logiit jew Weibull huma maħsuba għall-użu f'dejta kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u

▼M6

għandhom jiġu mmodifikati biex jakkomodaw id-dejta dwar ir-rata ta' tkabbir jew ir-rendiment. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn data kontinwa jistgħu jinstabu f'(14), (15), u (16).

61. Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x. Fejn ikun possibbli, għandhom jiġu stmati l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għal kull stima. Kemm toqgħod tajjeb id-dejta dwar ir-rispons għall-mudell ta' rigressjoni għandu jiġi vvalutat grafikament jew statistikament. L-analiżi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament.

62. Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (17), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibli m'humiex xierqa għad-data.

63. Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa meħtieġ li jitqabblu l-medji ta' trattament permezz ta' analiżi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni għandha mbagħad titqabbel mal-medja ta' kontroll permezz ta' tqabbil multiplu xieraq jew test ta' tendenza. It-test ta' Dunnett jew ta' Williams jista' jkun utili (18)(19)(20)(21). Huwa meħtieġ li jiġi vvalutat jekk treġġix is-suppożizzjoni tal-omoġeneità ta' varjanza ta' ANOVA. Din il-valutazzjoni tista' titwettaq grafikament jew b'test formali (22). Testijiet xierqa huma Levene jew Bartlett. Jekk is-suppożizzjoni ta' omoġeneità tal-varjanzi ma tkunx issodisfata, din kultant tista' tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, għandha tiġi kkunsidrata analiżi b'metodi bħat-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere. F'(16) tista' tinstab gwida addizzjonali li tiddetermina l-NOEC.

64. Żviluppi xjentifiċi riċenti wasslu għal rakkomandazzjoni biex jiġi abbandunat il-kunċett tal-NOEC u minflok jinbidel bi stimi EC_x ta' punti bbażati fuq regressjoni. Valur xieraq għal x ma ġiex stabbilit għal dan it-test ta' *Lemna*. Madankollu, sensiela ta' minn 10 sa 20 % tidher xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment l-EC_{10} u l-EC_{20} għandhom jiġu rrapurtati t-tnejn li huma.

Rapportar

65. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tal-ittestjar:

— natura fiżika u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti, inkluż il-limitu tas-solubbiltà fl-ilma;

— dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (eż. Numru CAS), inkluż il-purità (impuritajiet).

Speċijiet tat-test:

— isem xjentifiku, klonu (jekk ikun magħruf) u sors.

Kundizzjonijiet tal-ittestjar:

— proċedura tal-ittestjar użata (statika, semistatika jew bi fluss kontinwu);

— id-data tal-bidu tal-ittestjar u d-durata tiegħu;

— midjum tat-test;

— deskrizzjoni tad-disinn sperimentali: reċipjenti u għotjien tat-test, volumi ta' soluzzjonijiet, numru ta' kolonji u frondi għal kull reċipjent tat-test fil-bidu tat-test;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test (nominali u mkejla kif xierqa) u n-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni;

▼**M6**

— metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u tat-test inkluż l-użu ta' kwalunkwe solvent jew aġent dispersiv;

— temperatura matul it-test;

— sors ta' dawl, intensità tad-dawl u omoġenità;

— valuri tal-pH tal-midjums tat-test u ta' kontroll;

— konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u l-metodu tal-analiżi b'dejta ta' valutazzjoni tal-kwalità xierqa (studji ta' validazzjoni, devjazzjonijiet standard jew limiti ta' kunfidenza tal-analiżijiet);

— metodi għad-determinazzjonijiet tan-numru ta' frondu u varjabbli ta' kejl oħrajn, eż. piż xott, piż frisk jew erja tal-frond;

— id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Riżultati:

— dejta mhux ipproċessata: numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl oħra f'kull reċipjent tat-test u ta' kontroll f'kull osservazzjoni u okkażjoni ta' analiżi;

— medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta' kejl;

— kurvi ta' tkabbir għal kull konċentrazzjoni tat-test (rakkomandati b'varjabbli ta' kejl ittrasformati bil-log, ara l-paragrafu 55);

— ħin għall-irdoppjar/rata ta' tkabbir fil-kontroll abbażi tan-numru ta' frondi;

— il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki;

— rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett;

— stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi għal varjabbli ta' rispons eż. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikunu kkalkolati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— jekk tintuża ANOVA, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. id-differenza l-inqas sinifikanti);

— kwalunkwe stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament;

— kwalunkwe sinjal viżwali tal-fitotossiċità kif ukoll l-osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

LETTERATURA

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

(3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼M6

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.)

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) Organizzazzjoni Internazzjonali għall-Istandardizzazzjoni (International Organization for Standardization.). ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 18. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713-718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(22) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-finijiet ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jintużaw id-definizzjonijiet u l-abbrevazzjonijiet li ġejjin:

Il-**bijomassa** hija l-piż xott tal-materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test, is-surrogati għall-bijomassa, bħall-għadd ta' frondi jew l-erja tal-frondi, ġeneralment jitkejlu u għalhekk l-użu tat-terminu "bijomassa" jirreferi għal dawn il-kejliet ta' surrogati wkoll.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Klorożi hija s-sfurija tat-tessut ta' frond.

Klonu huwa organiżmu jew ċellola li nħolqot minn individwu singolu b'riproduzzjoni asseswali. Għalhekk, l-individwi mill-istess klonu huma ġenetikament identiċi.

Kolonja tfisser aggregat ta' frondi ommijiet u bniet (ġeneralment 2 sa 4) imwaħħla ma' xulxin. Xi drabi jissejħu pjanta.

$\mathbf{EC_x}$ hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test maħlula fil-midjum tat-test li tirriżulta f'tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir ta' *Lemna* f'perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat (li għandu jissemma b'mod espliċitu jekk ikun hemm devjazzjoni mid-durata tat-test kollu jew normali). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew rendiment, is-simbolu "E_rC" huwa użat għar-rata ta' tkabbir u "E_yC" huwa użat għar-rendiment, segwit mill-varjabbli ta' kejl użat, eż. E_rC (għadd ta' frond).

Bi fluss kontinwu huwa test fejn is-soluzzjonijiet tat-test jiġu ssostitwiti b'mod kontinwu.

Frond huwa struttura individwali/unika "qisha werqa" ta' pjanta duckweed. Hija l-iżgħar unità, jiġifieri individwu, li jista' jirriproduċi.

Gibbożità tfisser frondi li huma mħattbin jew minfuħin.

Tkabbir hija żieda fil-varjabbli ta' kejl, eż. numru ta' frondi, piż xott, piż imxarrab, jew erja tal-frondi, matul il-perjodu tal-ittestjar.

Rata ta' tkabbir (rata ta' tkabbir speċifika medja) hija ż-żieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu ta' espożizzjoni.

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir (b'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'ħin ta' espożizzjoni partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż ugwali jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Varjabbli ta' kejl huma kwalunkwe tip ta' varjabbli li jitkejlu biex jiġi espress il-punt ta' tmiem tal-ittestjar permezz ta' varjabbli ta' rispons differenti wieħed jew iktar. F'dan il-metodu, in-numru ta' frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk u l-piż xott huma varjabbli ta' kejl.

Monokultura hija kultura bi speċi ta' pjanta waħda.

Nekrożi huwa tessut ta' frond mejjet (jiġifieri abjad jew imxarrab fl-ilma).

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taħt l-LOEC.

Fenotip huma l-karatteristiċi osservabbli ta' organiżmu ddeterminati mill-interazzjoni tal-ġeni tiegħu mal-ambjent tiegħu.

Il-varjabbli ta' rispons huma varjabbli għall-istima tat-tossiċità derivati minn kwalunkwe parametru mkejjel li jiddeskrivi l-bijomassa minn metodi differenti ta' kalkolu. Għal dan il-Metodu ta' Ttestjar, ir-rati ta' tkabbir u r-rendiment huma varjabbli ta' rispons derivati mill-varjabbli ta' kejl bħan-numru ta' frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk jew il-piż xott.

▼**M6**

Test semistatiku (tiġdid) huwa test fejn is-soluzzjoni tat-test tiġi sostitwita perjodikament f'intervalli speċifiċi matul it-test.

Test statiku huwa metodu ta' ttestjar mingħajr tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

Sustanza kimika tat-test hija sustanza jew taħlita ttestjata matul dan il-metodu ta' ttestjar.

Punt ta' tmiem tat-test jiddeskrivi l-fattur ġenerali li sejjer jinbidel b'mod relattiv għall-kontroll mis-sustanza kimika tat-test bħala mira tat-test. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-punt ta' tmiem tal-ittestjar hija l-inibizzjoni li tista' tiġi espressa b'varjabbli ta' rispons differenti li huma bbażati fuq varjabbli ta' kejl wieħed jew iktar.

Midjum tat-test huwa midjum ta' tkabbir sintetiku komplut li fuqu jikbru l-pjanti tal-ittestjar meta esposti għas-sustanza kimika tat-test. Is-sustanza kimika tat-test sejra tinħall fil-midjum tat-test.

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex tiġi espressa l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni.

▼M6

Appendiċi 2

Deskrizzjoni ta' *Lemna* spp.

Il-pjanta akkwatika, li komunement tissejjaħ duckweed, *Lemna* spp., tagħmel parti mill-familja Lemnaceae li għandha numru ta' speċijiet mad-dinja kollha f'erba' ġeneri. Id-dehra u t-tassonomija differenti tagħhom ġew deskritt b'mod eżawrjenti (1)(2). *Lemna gibba* u *L. minor* huma speċijiet rappreżentattivi ta' erjas b'temperatura moderata u huma komunement użati għal testijiet ta' tossiċità. Iż-żewġ speċijiet għandhom fergħa (frond) diskojdi li żżomm ril-wiċċ jew mgħaddsa u għerq irqiq ħafna ħiereġ miċ-ċentru tal-wiċċ ta' isfel ta' kull frond. *Lemna* spp. rarament jipproduċu fjuri u l-pjanti jirriproduċu billi veġetattivament jipproduċu frondi ġodda (3). Meta mqabbla ma' pjanti li għandhom iktar żmien, iż-żgħar għandhom tendenza li jkunu iktar ċari, ikollhom għeruq iqsar u jikkonsistu minn tnejn sa tliet frondi b'qisien differenti. Id-daqs żgħir tal-*Lemna*, l-istruttura sempliċi, ir-riproduzzjoni asseswali u l-ħin ta' ġenerazzjoni qasir tagħha jagħmlu l-pjanti ta' dan il-ġeneru adattati ħafna għall-ittestjar fil-laboratorju (4)(5).

Minħabba l-varjazzjoni probabbli bejn l-ispeċijiet fis-sensittività, huma validi biss paraguni ta' sensittività fi ħdan speċi.

Eżempji ta' speċijiet ta' *Lemna* li ntużaw għall-ittestjar: Referenza għall-Ispeċijiet

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major : Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla)*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Sources of *Lemna* species

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
United States
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SWEDEN
Tel: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
e-mail: lemna@uba.de

LETTERATURA

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M6**

Appendiċi 3

Żamma tal-kultura ewlenija

Koltivazzjonijiet ikkonċentrati jistgħu jiġu miżmuma f'temperaturi iktar baxxi (4-10 °C) għal żmien itwal mingħajr il-bżonn li jerġgħu jsiru mill-ġdid. Il-midjum ta' tkabbir ta' *Lemna* jista' jkun l-istess bħal dak għall-ittestjar iżda jistgħu jintużaw midjums rikki fin-nutrijenti oħra għall-kulturi ewlenin.

Perjodikament, numru ta' pjanti ħodor ċari, żgħar jitpoġġew f'kontenituri tal-kultura li fihom midjum ġdid permezz ta' teknika aseptika. Fil-kundizzjonijiet iktar kesħin issuġġeriti hawnhekk, jistgħu jitwettqu sottokulturi f'intervalli sa tliet xhur.

Għandhom jintużaw reċipjenti tal-kulturi tal-ħġieġ kimikament nodfa (maħsula bl-aċidu) u sterilizzati kif ukoll tekniki ta' mmaniġġar asettiċi. Fil-każ ta' kontaminazzjoni tal-kultura ewlenija, eż. b'algi jew fungi, huma meħtieġa passi biex jiġu eliminati l-organiżmi kontaminanti. Fil-każ ta' algi u l-biċċa l-kbira ta' organiżmi kontaminanti oħra, dan jista' jintlaħaq bl-isterilizzazzjoni tal-wiċċ. Jittieħed kampjun tal-materjal tal-pjanta kkontaminat u l-għeruq jinqatgħu. Il-materjal imbagħad jitħawwad bis-saħħa f'ilma nadif, segwit minn immersjoni f'soluzzjoni ta' 0,5 % (v/v) ipoklorit tas-sodju għal bejn 30 sekonda u 5 minuti. Imbagħad il-materjal tal-pjanta jitlaħlaħ b'ilma sterili u jiġi ttrasferit, bħala numru ta' lottijiet, f'reċipjenti ta' kulturi li fihom midjum tat-tkabbir frisk. Ħafna mill-frondi sejrin imutu bħala riżultat ta' dan it-trattament, speċjalment jekk jintużaw perjodi ta' espożizzjoni itwal, iżda xi whud minn dawk li jibqgħu ħajjin ġeneralment sejrin ikunu ħielsa mill-kontaminazzjoni. Imbagħad dawn jistgħu jintużaw biex jerġgħu jinokulaw kulturi ġodda.

▼M6

Appendiċi 4

Midjums

Huma rakkomandati midjums ta' tkabbir differenti għal *L. minor* u *L. gibba*. Għal *L. minor*, huwa rakkomandat midjum ta' Standard Svediż (SIS) immodifikat filwaqt li għal *L. gibba*, huwa rakkomandat midjum 20X AAP. Il-kompożizzjonijiet taż-żewġ midjums jingħataw hawn taħt. Meta jiġu ppreparati dawn il-midjums, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi ta' reaġent jew grad analitiku u ilma dejonizzat.

Midjum ta' tkabbir *Lemna* ta' Standard Svediż (SIS)

— Soluzzjonijiet ikkonċentrati I — V huma sterilizzati b'awtoklavazzjoni (120 °C, 15-il minuta) jew b'tisfija minn membrana (b'daqs tal-pori ta' ċirka 0,2 μm).

— L-Istokk VI (u b'mod fakultattiv VII) jiġu sterlizzati bil-filtrazzjoni tal-membrana biss; dawn ma għandhiex issirilhom awtoklavazzjoni.

— Soluzzjonijiet ewlenin sterilizzati għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet friski u fid-dlam. L-Istokkijiet I — V għandhom jintremew wara sitt xhur filwaqt li l-istokkijiet VI (u b'mod fakultattiv VII) għandhom żmien tal-ħżin ta' xahar.

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/l)	Konċentrazzjoni f'midjums imħejjija (mg/•l)	Midjum imħejji	
				Element	Konċentrazzjoni (mg/•l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4. 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (bafer)	490	490	—	—

Biex tħejji litru ta' midjum SIS, dan li ġej jiżdied ma' 900 ml ta' ilma dejonizzat:

▼**M6**

— 10 ml ta' soluzzjoni ewlenija I

— 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija II

— 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija III

— 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija IV

— 1 ml ta' soluzzjoni ewlenija V

— 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija VI

— 1 ml ta' soluzzjoni ewlenija VII (fakultattiva)

Nota: Soluzzjoni ewlenija oħra VII (buffer MOPS) jaf tkun meħtieġa għal ċerti sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafu 11).

Il-pH huwa aġġustat għal 6,5 ± 0,2 b'0,1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustat għal litru b'ilma dejonizzat.

Midjum ta' tkabbir 20X AAP

Soluzzjonijiet ewlenin jiġu ppreparati f'ilma distillat jew dejonizzat sterilizzat.

Soluzzjonijiet ewlenin sterilizzati għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet friski u fid-dlam. F'dawn il-kundizzjonijiet, is-soluzzjonijiet ewlenin sejrin ikollhom żmien tal-ħżin ta' mill-anqas 6 — 8 ġimgħat.

Jiġu ppreparati ħames soluzzjonijiet ewlenin tan-nutrijenti (A1, A2, A3, B u C) għal midjum 20X — AAP, permezz ta' sustanzi kimiċi tal-grad tar-reaġenti. L-20 ml ta' kull soluzzjoni ewlenija tan-nutrijenti jiżdied ma' madwar 850 ml ta' ilma dejonizzat biex jiġi prodott il-midjum tat-tkabbir. Il-pH huwa aġġustat għal 7,5 ± 0,1 b'0,1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustati għal litru b'ilma dejonizzat. Il-midjum imbagħad jiġi ffiltrat permezz ta' (madwar) 0,2 μm tal-filtru tal-membrani f'kontenitur sterilizzat.

Il-midjum tat-tkabbir maħsub għall-ittestjar għandu jiġi ppreparat 1-2 jum qabel l-użu biex iħalli lill-pH jistabbilizza. Il-pH tal-midjum tat-tkabbir għandu jiġi ċċekkjat qabel l-użu u jerġa' jiġi aġġustat biż-żieda ta' 0,1 jew 1 mol NaOH jew HCl kif deskritt hawn fuq.

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/•l) (*)	Konċentrazzjoni f'midjum ippreparat (mg/•l)	Midjum imħejji	
				Element	Konċentrazzjoni (mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na;N	190;84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	1,4	30	K;P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/•l) (*)	Konċentrazzjoni f'midjum ippreparat (mg/•l)	Midjum imħejji	
				Element	Konċentrazzjoni (mg/•l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220; 43

(*) Sakemm mhux innotat

Nota: Il-konċentrazzjoni finali teoretikament xierqa tal-bikarbonat (li tevita aġġustament apprezzabbli tal-pH) hija mhux 300 mg/L. Madankollu, l-użu storiku ta' midjum 20X-AAP, inkluż ir- ring test għal din il-linja gwida, huwa bbażat fuq 300 mg/L. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.)

Midjum STEINBERG (Wara l-ISO 20079)

Konċentrazzjoni u soluzzjonijiet ewlenin

Il-midjum Steinberg immodifikat jintuża f'ISO 20079 għal *Lemna* minuri waħdu (peress li hemm *Lemna minor* biss huwa permess) iżda t-testijiet urew li jistgħu jintlaħqu riżultati tajba b'*Lemna gibba* wkoll.

Meta tipprepara l-midjum, għandhom jintużaw reaġent jew sustanzi kimiċi tal-grad analitiku u ilma dejonizzat.

Ipprepara l-midjum tal-nutrijenti mis-soluzzjonijiet ewlenin k jew il-midjum ikkonċentrat ta' 10 darbiet il-konċentrazzjoni massima tal-midjum mingħajr preċipitazzjoni.

Tabella 1

Midjum STEINBERG stabbilizzat bil-pH (immodifikat skont Altenburger)

Komponent		Midjum tan-nutrijent	
Makroelementi	piż mol	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Komponent		Midjum tan-nutrijent	
Mikroelementi	piż mol	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA Disodju-diidrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabella 2

Soluzzjonijiet ewlenin (Makroelementi)

1. Makroelementi (ikkonċentrati għal 50 darba)	**g/l**
Soluzzjoni ewlenija 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Soluzzjoni ewlenija 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Soluzzjoni ewlenija 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabella 3

Soluzzjonijiet ewlenin (Mikroelementi)

2. Mikrolementi (ikkonċentrati għal 1 000 darba)	**mg/l**
Soluzzjoni ewlenija 4:	
H_3BO_3	120,0
Soluzzjoni ewlenija 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Soluzzjoni ewlenija 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Soluzzjoni ewlenija 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Soluzzjoni ewlenija 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA Disodju-diidrat	1 500,00

— Is-soluzzjonijiet ewlenin 2 u 3 u b'mod separat 4 sa 7 jiistgħu jiġu raggruppati (filwaqt li jitqiesu l-konċentrazzjonijiet meħtieġa).

▼**M6**

— Għal żmien tal-ħżin itwal ittratta s-soluzzjonijiet ewlenin f'awtoklava f'121 °C għal 20 minuta jew inkella wettaq filtrazzjoni sterilizzata (0,2 μm). Għas-soluzzjoni ewlenija 8 hija rakkomandata ħafna filtrazzjoni sterili (0,2 μm).

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni finali tal-midjum STEINBERG (immodifikat)

— Żid 20 ml ta' soluzzjonijiet ewlenin 1, 2 u 3 (ara t-tabella 2) ma' madwar 900 ml ta' ilma dejonizzat biex tevita preċipitazzjoni.

— Żid 1,0 ml ta' soluzzjonijiet ewlenin 4, 5, 6, 7 u 8 (ara t-tabella 3).

— Il-pH għandu jkun 5,5 +/– 0,2 (aġġusta b'żieda ta' volum minimizzat ta' soluzzjoni NaOH jew HCl).

— Aġġusta bl-ilma għal 1 000 ml.

— Jekk is-soluzzjonijiet ewlenin huma sterlizzati u jintuża ilma xieraq, ma tkun meħtieġa ebda sterilizzazzjoni ulterjuri. Jekk l-isterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, wara l-awtoklavazzjoni għandha tiżdied is-soluzzjoni ewlenija 8 (f'121 °C għal 20 min).

Il-preparazzjoni ta' midjum STEINBERG b'konċentrazzjoni ta' 10 darbiet (immodifikat) għal ħżin intermedju

— Żid 20 ml soluzzjonijiet ewlenin 1, 2 u 3 (ara t-tabella 2) ma' madwar 30 ml ta' ilma biex tevita preċipitazzjoni.

— Żid 1,0 ml soluzzjonijiet ewlenin 4, 5, 6, 7 u 8 (ara t-tabella 3). Aġġusta bl-ilma għal 100 ml.

— Jekk is-soluzzjonijiet ewlenin huma sterlizzati u jintuża ilma xieraq, ma tkun meħtieġa ebda sterilizzazzjoni ulterjuri. Jekk l-isterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, wara l-awtoklavazzjoni għandha tiżdied is-soluzzjoni ewlenija 8 (f'121 °C għal 20 min).

— Il-pH tal-midjum (konċentrazzjoni finali) għandha tkun 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA BL-UŻU TA' SEDIMENT IMĦALLAT

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 218 (2004) tal-OECD. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa nfassal biex jivvaluta l-effetti ta' espożizzjoni prolongata tal-kimiċi għal-larvi li jgħixu fis-sediment tad-dipteran tal-ilma ħelu *Chironomus* sp. Huwa bbażat fuq protokolli eżistenti tat-test tat-tossiċità għal *Chironomus riparius* u *Chironomus tentans* li ġew żviluppati fl-Ewropa (1)(2)(3) u fl-Amerika tat-Tramuntana (4)(5)(6)(7)(8) u sarilhom ir-ring test (1)(6)(9). Jistgħu jintużaw ukoll speċijiet oħra ta' kironomidi iddokumentati sewwa, eż. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Ix-xenarju ta' espożizzjoni użat f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa sediment fortifikat bis-sustanza għall-ittestjar. L-għażla tax-xenarju adatt ta' espożizzjoni tiddependi mill-applikazzjoni maħsuba tat-test. Ix-xenarju ta' sediment fortifikat huwa maħsub li jissimula livelli akkumulati ta' kimiċi li jippersistu fis-sediment. Din is-sistema ta' espożizzjoni tinvolvi sediment fortifikat ta' sistema ta' ttestjar ta' sediment-ilma.

3. Sustanzi li jeħtiġilhom ikunu ttestjati għal organiżmi li jgħixu f'sediment is-soltu jippersistu f'dan il-kompartiment tul perjodi twal ta' żmien. L-organiżmi li jgħixu f'sediment jistgħu jkunu esposti permezz ta' għadd ta' rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni u taż-żmien meħud għal kull waħda biex tikkontribwixxi għall-effetti tossiċi globali, tiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika konċernata. Għal sustanzi li jassorbixxu ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5) jew għal sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-inġestjoni ta' ikel kontaminat tista' tkun rotta sinifikanti ta' espożizzjoni. Biex it-tossiċità ta' sustanzi lipofiliċi ħafna ma tkunx sottovalutata, jista' jitqies l-użu ta' ikel miżjud mas-sediment qabel l-applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar. Biex jittieħdu r-rotot potenzjali kollha ta' espożizzjoni l-fokus ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar ikun fuq espożizzjoni fit-tul. It-testijiet idumu madwar 20 - 28 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u 28 - 65 jum għal *C. tentans*. Jekk tkun meħtieġa dejta għal żmien qasir għal għan speċifiku, pereżempju biex ikunu mistħarrġa l-effetti ta' kimika instabbli, replikati addizzjonali jistgħu jitneħħew wara perjodu ta' għaxart ijiem.

4. Il-punti ta' tmiem imkejla huma l-għadd totali ta' adulti li jkunu evolvew u ż-żmien li jkunu ħadu biex evolvew. Huwa rrakkomandat li l-kejl tas-sopravivenza u tat-tkabbir tal-larvi għandu jsir biss wara perjodu ta' għaxart ijiem jekk tkun meħtieġa dejta addizzonali għal żmien qasir, billi jintużaw replikati addizzjonali skont il-każ.

5. Huwa rrakkomandat l-użu ta' sediment formulat. Sediment formulat għandu diversi vantaġġi fuq sedimenti naturali:

— il-varjabbiltà sperimentali titnaqqas minħabba li jifforma "matriċi standardizzata" riproduċibbli u l-ħtieġa li jinstabu sorsi ta' sediment mhux kontaminati u nodfa tkun eliminata;

— it-testijiet jistgħu jibdew f'kull żmien mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà staġonali fis-sediment tat-test u ma jkunx hemm ħtieġa li s-sediment ikun ittrattat minn qabel biex titneħħa fawna indiġena; l-użu ta' sediment formulat inaqqas ukoll l-ispiża b'rabta mal-ġabra mill-post ta' ammonti suffiċjenti ta' sediment għal testijiet ta' rutina;

— l-użu ta' sediment formulat jippermetti li jsiru tqabbiliet ta' tossiċità u gradazzjoni ta' sustanzi b'dan il-mod.

6. Definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

▼M4

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel fażi ta' larvi kironomidi jkunu esposti għal firxa ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'sistemi ta' sediment u ilma. Is-sustanza għall-ittestjar tkun iffortifikata fis-sediment u l-larvi tal-ewwel fażi mbagħad jiddaħħlu f'bekkijiet tat-test li fihom il-konċentrazzjonijiet ta' sediment u ilma jkunu saru stabbli. Ir-rata ta' evoluzzjoni u żvilupp ta' kironomidi titkejjel fit-tmiem tat-test. Is-sopravivenza u l-piż tal-larvi jistgħu jitkejlu wkoll wara 10 ijiem jekk ikun meħtieġ (billi jintużaw replikati addizzjonali skont kif ikun xieraq). Din id-dejta tkun analizzata jew billi jintuża mudell ta' rigressjoni biex tkun stmata l-konċentrazzjoni li għandha tikkawża x % tnaqqis fl-evoluzzjoni, fis-sopravivenza jew fit-tkabbir tal-larvi (eż. EC_{15}, EC_{50} eċċ.), jew billi jintuża ttestjar ta' ipoteżi ta' statistika biex ikun iddeterminat NOEC/LOEC. Dan tal-aħħar ikun jeħtieġlu tqabbil ta' valuri ta' effett ma' valuri ta' kontroll billi jintużaw testijiet ta' statistika.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA GĦALL-ITTESTJAR

8. Is-solubilità fl-ilma tas-sustanza għall-ittestjar, il-pressjoni tal-fwar tagħha, il-partizzjoni mkejla jew ikkalkulata f'sediment u l-istabbiltà fl-ilma u fis-sediment għandhom ikun magħrufin. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f'ilma ta' fuq, f'ilma tal-pori u f'sediment b'akkuratezza magħrufa u rrapportata u b'limitu ta' detezzjoni. Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali u l-purezza tas-sustanza għall-ittestjar. Dak li jiġrilha kimikament is-sustanza għall-ittestjar (eż. tixrid, degradazzjoni abijotika u bijotika, eċċ.) ukoll huwa informazzjoni utli. Aktar gwida għall-ittestjar ta' sustanzi bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluha diffiċli għalihom li jsirilhom it-test tingħata fi (12).

KIMIĊI TA' REFERENZA

9. Kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu ttestjati perjodikament bħala mezz li jiżgura li l-protokoll tat-test u l-kondizzjonijiet tat-test ikunu affidabbli. Eżempji ta' sustanzi tossiċi ta' referenza użati b'suċċess f'ring-tests u fi studji ta' validazzjoni huma: lindane, trifluralin, pentaklorurfenol, klorur tal-kadmju u klorur tal-potassju (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDITÀ TAT-TEST

10. Biex it-test ikun validu japplikaw il-kondizzjonijiet li ġejjin:

— l-evoluzzjoni fil-kontrolli għandha tkun mill-anqas 70 % fit-tmiem tat-test. (1)(6);

— l-evoluzzjoni ta' C. riparius u C. yoshimatsui għal adulti minn reċipjenti ta' kontroll għandha sseħħ bejn 12 u 23 jum wara li jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti; għal C. tentans, ikun meħtieġ perjodu ta' 20 sa 65 jum.

— fit-tmiem tat-test, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul għandhom jitkejlu f'kull reċipjent. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu għandha tkun mill-anqas 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV) fit-temperatura użata, u l-pH tal-ilma ta' fuq għandu jkun fil-firxa ta' 6-9 fir-reċipjenti kollha tal-ittestjar;

— it-temperatura tal-ilma mhux suppost tvarja b'iktar minn ± 1,0 C. It-temperatura tal-ilma tista' tkun ikkontrollata b'kamra iżotermika u f'dak il-każ it-temperatura tal-kamra għandha tkun ikkonfermata f'intervall xieraq ta' ħin.

▼M4

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Reċipjenti tat-test

11. L-istudju jitwettaq f'bekkijiet tal-ħġieġ ta' 600 ml b'dijametru qies ta' 8 cm. Reċipjenti oħra jkunu tajbin, iżda għandhom jiggarantixxu fond sewwa tal-ilma ta' fuq u tas-sediment. Il-wiċċ tas-sediment għandu jkun suffiċjenti biex jipprovdi 2 sa 3 cm^2 għal kull larva. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tas-sediment mal-fond tal-ilma ta' fuq għandu jkun 1:4. Reċipjenti tat-test u apparat ieħor li jiġu f'kuntatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kollha mill-ħġieġ jew minn materjal ieħor kimikament inerti (eż. Teflon).

Għażla ta' speċi

12. L-ispeċi li għandha tintuża fit-test preferibbilment hija *Chironomus riparius*. Chironomus tentans hija adatta wkoll iżda aktar diffiċli biex tkun ittrattata u jeħtiġilha perjodu itwal ta' test. Tista' tintuża wkoll Chironomus yohimatsui. Dettalji ta' metodi ta' kultura jingħataw fl-Appendiċi 2 għal Chironomus riparius. Informazzjoni dwar kondizzjonijiet ta' kultura hija wkoll disponibbli għal speċijiet oħra, jiġifieri għal Chironomus tentans (4) u Chironomus yoshimatsui (11). L-identifikazzjoni ta' speċijiet għandha tkun ikkonfermata qabel l-ittestjar iżda ma tkunx meħtieġa qabel kull test jekk organiżmi jkunu ġejjin minn kultura interna.

Sediment

13. Preferibbilment għandu jintuża sediment formulat (msejjaħ ukoll sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Iżda, jekk jintuża sediment naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (huma wkoll irrakkomandati mill-anqas pH, kontenut ta' karbonju organiku, determinazzjoni ta' parametri oħra bħal proporzjon ta' C/N u granulometrija), u għandu jkun ħieles minn kull kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu ma', jew jikkunsmaw lill-kironomidi. Huwa wkoll irrakkomandat li, qabel ma jintuża f'test tat-tossiċità tal-kironomidi, is-sediment naturali jkun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taħt l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti. Huwa rrakkomandat li f'dan it-test jintuża s-sediment formulat li ġej, ibbażat fuq il-ħamrija artifiċjali użata fil-Metodu ta' Ttestjar C.8 (14) (1)(15)(16):

(a) 4-5 % pit (piż fin-niexef): qrib kemm jista' jkun pH 5,5 sa 6,0; huwa importanti li jintuża pit f'għamla ta' trab, miħun fin (partiċelli ta' daqs ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja biss.

(b) 20 % tafal tal-kawlina (piż fin-niexef) (kontenut ta' kawlina preferibbilment aktar minn 30 %).

(c) 75-76 % ramel tal-quartz (piż fin-niexef) (għandu jippredomina ramel fin b'aktar minn 50 % tal-partiċelli bejn 50 u 200 μm).

(d) Jiżdied ilma dejonizzat biex jinkiseb kontenut ta' rtuba tat-taħlita finali f'firxa ta' 30-50 %.

(e) Jiżdied karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura (CaCO3) biex ikun aġġustat il-pH tat-taħlita finali tas-sediment għal 7,0 ± 0,5. Il-kontenut ta' karbonju organiku tat-taħlita finali għandu jkun 2 % (± 0,5 %) u għandu jkun aġġustat b'ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

14. Is-sors tal-pit, tafal tal-kawlina u ramel għandha tkun magħrufa. Il-komponenti tas-sediment għandhom ikunu eżaminati għan-nuqqas ta' kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti tal-organokloru, komposti organofosforuži, eċċ.). Eżempju għat-tħejjija tas-sediment formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-taħlit ta' kostitwenti nixfin ikun ukoll aċċettabbli jekk jintwera li wara li jkun żdied l-ilma ta' fuq ma sseħħx separazzjoni tal-kostitwenti tas-sediment (eż. biċċiet tal-pit fil-wiċċ tal-ilma), u li l-pit jew is-sediment ikunu kkondizzjonati b'mod suffiċjenti.

▼M4

Ilma

15. Kull ilma li jkun konformi mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma dilwit b'mod aċċettabbli kif elenkat fl-Appendiċijiet 2 u 4 ikun tajjeb bħala ilma tat-test. Kull ilma tajjeb, ilma naturali (ilma tal-wiċċ jew ta' taħt l-art), ilma rikostitwit (ara l-Appendiċi 2) jew ilma tal-vit li jkun tneħħielu l-kloru jkun aċċettabbli bħala ilma ta' kultura u ilma tat-test jekk kironomidi jibqgħu jgħixu fih sakemm idumu l-kultura u t-testjar mingħajr ma juru sinjal ta' stress. Fil-bidu tat-test, il-pH tal-ilma tat-test għandu jkun bejn 6 u 9 u t-total ta' melħ minerali fl-ilma ma jkunx ogħla minn 400 mg/l bħala $CaCO_3$. Iżda, jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni). Għandu jintuża l-istess tip ta' ilma tul l-istudju kollu. Il-karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma elenkati fl-Appendiċi 4 għandhom jitkejlu mill-anqas darbtejn fis-sena jew meta jkun hemm suspett li dawn il-karatteristiċi jkunu setgħu nbidlu b'mod sinifikanti.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet - Sedimenti ffortifikati

16. Sedimenti mħalltin tal-konċentrazzjoni magħżula s-soltu jitħejjew biż-żieda ta' soluzzjoni tas-sustanza għall-ittestjar direttament mas-sediment. Soluzzjoni ta' stokkijiet tas-sustanza għall-ittestjar maħlula f'ilma dejonizzat titħallat mas-sediment formulat b'mitħan romblu, b'mikser tal-għalf jew billi titħallat bl-idejn. Jekk ftit titħallat fl-ilma, is-sustanza għall-ittestjar tista' tinħall f'volum kemm jista' jkun żgħir ta' solvent organiku adatt (eż. eżanu, aċeton jew kloroform). Din is-soluzzjoni mbagħad titħallat ma' 10 g ta' ramel fin tal-quartz għal reċipjent wieħed tat-test. Is-solvent jitħalla jevapora u għandu jitneħħa għal kollox mir-ramel; ir-ramel imbagħad jitħallat mal-ammont adatt ta' sediment għal kull bekk tat-test. Jistgħu jintużaw biss aġenti li jsiru volatili malajr biex iħollu, ixerrdu jew jemulsifaw is-sustanza għall-ittestjar. Huwa mfakkar li għandu jitqies ir-ramel ipprovdut mis-sustanza għall-ittestjar u mit-taħlita tar-ramel meta jkun qed jitħejja s-sediment (jiġifieri s-sediment għandu, għalhekk, jitħejja b'anqas ramel). Għandha tingħata attenzjoni biex ikun żgurat li s-sustanza għall-ittestjar miżjuda mas-sediment titqassam sewwa u ma' kullimkien fis-sediment. Jekk ikun meħtieġ, jistgħu jkunu analizzati kampjuni sekondarji biex ikun iddeterminat il-grad ta' omoġeneità.

DISINN TAT-TEST

17. Id-disinn tat-test jirrelata mal-għażla tal-għadd u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-testijiet, mal-għadd ta' reċipjenti għal kull konċentrazzjoni u mal-għadd ta' larvi għal kull reċipjent. Huma deskritti disinji għal stima ta' punti ta' EC, għal stima ta' NOEC u biex jitmexxa test ta' limitu.

Disinn għal analiżi b'rigressjoni

18. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC_{15}, EC_{50}) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom jingħaqdu bil-konċentrazzjonijiet inklużi fit-test. Ġeneralment, l-akkuratezza u l-aktar il-validità, li bihom ikunu jistgħu jsiru stimi ta' konċentrazzjonijiet ta' effetti (EC_x), titjieb meta l-konċentrazzjoni ta' effetti tkun fil-firxa ta' konċentrazzjonijiet ittestjati. Estrapolazzjoni ħafna taħt il-konċentrazzjoni pożittiva l-aktar baxxa jew 'il fuq mill-ogħla konċentrazzjoni għandha tkun evitata. Test preliminari biex jinstabu firxiet ikun utli biex tintgħażel il-firxa ta' konċentrazzjonijiet li jkollhom jintużaw (ara l-paragrafu 27)).

▼M4

19. Jekk għandu jkun stmat EC_x, għandhom ikunu ttestjati mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet u tliet replikati għal kull konċentrazzjoni. Huwa rrakkomandat li jintużaw konċentrazzjonijiet suffiċjenti ta' testijiet biex titħalla ssir stima tajba ta' mudell. Il-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet meta l-kurva ta' rispons għad-doża jkollha anglu baxx). L-għadd ta' replikati f'kull trattament jista' jitnaqqas jekk l-għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti jiżdied. Iż-żieda fl-għadd ta' replikati jew it-tnaqqis fit-tul tal-intervalli tal-konċentrazzjoni tat-test jittendu li jwasslu għal intervall idjaq ta' kunfidenza għat-test. Ikunu meħtieġa replikati addizzjonali jekk għandhom ikunu stmati s-sopravivenza u t-tkabbir tal-larvi għal 10-ijiem.

Disinn għal stima ta' NOEC/LOEC

20. Jekk għandhom ikunu stmati LOEC jew NOEC, għandhom jintużaw ħames konċentrazzjonijiet tat-test b'mill-anqas erba' replikati u l-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn. L-għadd ta' replikati għandu jkun suffiċjenti biex tkun żgurata qawwa adegwata ta' statistika biex tinkixef differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikat ta' 5 % (p = 0,05). Bir-rata ta' żvilupp, Analiżi ta' Varjanza (ANOVA) is-soltu tkun adatta, bħat-test Dunnett u t-test Williams (17)(18)(19)(20). Fil-proporzjon ta' evoluzzjoni jistgħu jkunu użati t-testijiet Cochran-Armitage, dak eżatt ta' Fisher (bil-korrezzjoni ta' Bonferroni), jew ta' Mantel-Haenszel.

Test ta' limitu

21. Ikun jista' jsir test ta' limitu (konċentrazzjoni ta' test wieħed u kontroll) jekk ma jkun osservat ebda effett fit-test preliminari ta' detezzjoni ta' firxa. L-għan tat-test ta' limitu huwa li jitwettaq test f'konċentrazzjoni għolja biżżejjed biex dawk li jieħdu deċiżjonijiet ikunu jistgħu jeskludu effetti tossiċi li jista' jkun hemm tas-sustanza għall-ittestjar, u l-limitu jkun stabbilit f'konċentrazzjoni li ma tkunx mistennija li tidher f'kull sitwazzjoni. Huwa rrakkomandat 1 000 mg/kg (piż fin-niexef). Is-soltu jkunu meħtieġa mill-anqas sitt replikati kemm għat-trattament kif ukoll għall-kontroll. Għandha tintwera qawwa adegwata ta' statistika biex tinkixef differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikat ta' 5 % (p = 0,05). B'rispons metriku (rata ta' żvilupp u piż), it-t-test huwa metodu ta' statistika adatt jekk dejta tissodisfa l-ħtiġijiet ta' dan it-test (normalità, varjanzi omoġenji). Jista' jintuża t-t-test ta' varjanza inugwali jew test mhux parametriku, bħat-test Wilcoxon-Mann-Whithey, jekk dawn il-ħtiġijiet ma jkunux sodisfatti. Bil-proporzjon ta' evoluzzjoni, it-test eżatt ta' Fisher ikun adatt.

PROĊEDURA

Kondizzjonijiet ta' espożizzjoni

Thejjija ta' sistema ta' sediment u ilma ffortifikati

22. Hija rrakkomandata l-proċedura ta' fortifikazzjoni deskritta fil-Metodu ta' Ttestjar C.8: Tossiċità għal Ħniex għal applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar (14). Is-sedimenti ffortifikati jitqiegħdu fir-reċipjenti u jiżdied ilma ta' fuq biex jinġieb proporzjon ta' volum ta' sediment-ilma ta' 1:4 (ara l-paragrafi 11 u 15). Il-fond tas-saff tas-sediment għandu jkun fil-firxa ta' 1,5 - 3 cm.Biex ikunu evitati separazzjoni ta' ingredjenti tas-sediment u sospensjoni mill-ġdid ta' materjal fin matul iż-żieda ta' ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, is-sediment jista' jitgħatta b'diska tal-plastik waqt li jkun qed jitferra' ilma fiha, u d-diska titneħħa minnufih wara. Apparati oħra jistgħu wkoll ikunu adatti.

23. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu mgħottijin (eż. bi platti tal-ħġieġ). Jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju l-ilma jimtela sal-livell tal-volum oriġinali biex dan jagħmel tajjeb għall-evaporazzjoni tal-ilma. Dan għandu jsir billi jintuża ilma distillat jew dejonizzat biex ma jitħalliex jiżdied melħ.

▼M4

Stabilizzazzjoni

24. Malli jkun tħejja s-sediment iffortifikat bl-ilma ta' fuq, tkun ħaġa mixtieqa li titħalla ssir partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar mill-faži milwiema għas-sediment (3)(4)(6)(13). Preferibbilment dan għandu jsir skont il-kondizzjonijiet ta' temperatura u tirwiħ użati fit-test. Żmien xieraq ta' ekwilibrazzjoni huwa speċifiku għas-sediment u għall-kimika, u jista' jieħu minn sigħat sa jiem u f'każijiet rari sa diversi ġimgħat (4-5 ġimgħat). Minħabba li dan iħalli żmien għal degradazzjoni ta' ħafna kimiċi, ma jkunx mistenni ekwilibriju iżda huwa rrakkomandat perjodu ta' ekwilibrazzjoni ta' 48 siegħa. Fit-tmiem ta' dan il-perjodu ulterjuri ta' ekwilibrazzjoni, il-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar għandha titkejjel fl-ilma ta' fuq, fl-ilma tal-pori u fis-sediment, mill-anqas fl-ogħla konċentrazzjoni u f'waħda aktar baxxa (ara l-paragrafu 38). Dawn id-determinazzjonijiet analitiċi tas-sustanza għall-ittestjar jippermettu ssir kalkulazzjoni tal-bilanċ tal-massa u espressjoni ta' riżultati abbaži ta' konċentrazzjonijiet imkejla.

Żieda ta' organiżmi tat-test

25. Minn erba' sa ħamest ijiem qabel ma l-organiżmi tat-test jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test, għandhom jittieħdu kwantitajiet ta' bajd mill-kulturi u jitqiegħdu f'reċipjenti żgħar f'midjum ta' kulturi. Jista' jintuża midjum qadim mill-kultura ta' stokkijiet jew midjum li jkun għadu kif tħejja. Jekk jintuża dan tal-aħħar, ammont żgħir ta' ikel eż. alka ħadra u/jew ftit qatriet żgħar ta' filtrat minn sospensjoni miħuna fin ta' trofof ta' ikel tal-ħut għandu jiżdied mal-midjum tal-kultura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss kwantijiet ta' bajd miġbur frisk. Normalment, il-larvi jibdew ifaqqsu ftit jiem wara li jkun hemm il-bajd (2 sa 3 ijiem għal *Chironomus riparius* f'20 °C u 1 sa 4 ijiem għal *Chironomus tentans* fi 23 °C u *Chironomus yoshimatui* fi 25 °C) u jkun hemm tkabbir ta' larvi f'erba' fażijiet, kull faži ddum 4-8 ijiem. Fit-test għandhom jintużaw larvi tal-ewwel faži (2-3 jew 1-4 ijiem wara li jkunu faqqsu). Il-faži ta' pappamoski tista' possibbilment tkun ivverifikata billi jintuża l-wisa' tal-iskutella tar-ras (6).

26. Għoxrin larvi tal-ewwel faži jkunu allokati kif jinzertaw lil kull reċipjent tat-test li jkun fih is-sediment imħallat u l-ilma, billi tintuża pipetta mingħajr ponta. It-tirwiħ tal-ilma għandu jieqaf waqt li l-larvi jkunu qed jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test u jibqa' hekk għal 24 siegħa oħra wara li jkunu żdiedu l-larvi (ara l-paragrafi 25 u 32). Skont it-tifsila tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), l-għadd ta' larvi użati għal kull konċentrazzjoni jkun mill-anqas 60 għall-istima ta' punti ta' EC u 80 għal determinazzjoni ta' NOEC.

Konċentrazzjonijiet tat-test

27. Test ta' detezzjoni ta' firxa jista' jkun utli biex tkun iddeterminata l-firxa ta' konċentrazzjonijiet għat-test definittiv. Għal dan il-għan tintuża serje ta' konċentrazzjonijiet spazjati fil-wisa' tas-sustanza għall-ittestjar. Biex tkun ipprovduta l-istess densità tal-wiċċ għal kull kironomidu, li jkollu jintuża għat-test definittiv, kironomidi jkunu esposti għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar għal perjodu li jippermetti stima ta' konċentrazzjonijiet adatti ta' testijiet, u ma jkunx hemm ħtieġa ta' replikati.

28. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għat-test definittiv ikunu deċiżi abbaži tar-riżultat tat-test ta' detezzjoni ta' firxa. Mill-anqas għandhom jintużaw u jintgħażlu ħames konċentrazzjonijiet kif deskritt fil-paragrafi 18 sa 20.

▼M4

Kontrolli

29. Reċipjenti ta' kontroll mingħajr sustanza għall-ittestjar iżda li jkunu jinkludu sediment għandhom ikunu inklużi fit-test bl-għadd xieraq ta' replikati (ara l-paragrafi 19-20). Jekk ikun intuża solvent għal applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar (ara l-paragrafu 16), għandu jiżdied kontroll ta' solvent ta' sediment.

Sistema ta' ttestjar

30. Jintużaw sistemi statiċi. Sistemi semistatiċi jew ta' fluss kontinwu bl-ilma ta' fuq jiġġedded kull tant jew kontinwament jistgħu jintużaw f'każijiet eċċezzjonali bħal pereżempju jekk speċifikazzjonijiet tal-kwalità tal-ilma jisfaw ma jkunux adatti għall-organiżmu tat-test jew jaffettwaw l-ekwilibriju kimiku (eż. livelli ta' ossiġnu maħlul jinżlu baxxi ħafna, il-konċentrazzjoni ta' prodotti ta' ekskreta togħla żżejjed jew minerali jlissu minn sediment u jaffettwaw il-pH u/jew il-melħ minerali fl-ilma). Iżda metodi oħra biex titjieb il-kwalità tal-ilma ta' fuq, bħal tirwiħ, għandhom normalment ikunu biżżejjed u jkunu ppreferuti.

Ikel

31. Ikun meħtieġ li l-larvi jintemgħu, preferibbilment kuljum jew mill-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa. L-ikel tal-ħut (sospensjoni fl-ilma jew ikel miżħun fin, eż. TetraMin jew TetraPhyll; ara d-dettalji fl-Appendiċi 2) fl-ammont ta' 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg għal *C. yoshimatui*) għal kull larva kuljum jidher li jkun adegwat għal larvi żgħar għall-ewwel 10 ijiem. Jista' jkun meħtieġ ftit aktar ikel għal larvi li jkollhom aktar żmien: 0,5 - 1 mg għal kull larva kuljum għandu jkun suffiċjenti għall-bqija tat-test. Ir-razzjon tal-ikel għandu jitnaqqas fit-trattamenti kollha u l-kontrolli jekk ikun hemm tkabbir fungali jew jekk fil-kontrolli jkunu osservati mwiet. Jekk ma jkunx jista' jitwaqqaf żvilupp fungali t-test għandu jittenna. Meta jkunu qed jiġu ttestjati sustanzi li jassorbixxu ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5), jew sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-ammont ta' ikel meħtieġ biex ikunu żgurati sopravivenza u tkabbir naturali tal-organiżmi jista' jiżdied mas-sediment formulat qabel il-perjodu ta' stabbilizzazzjoni. Għal dan, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok ikel tal-ħut, eż. tista' tintuża żieda ta' 0,5 % (piż fin-niexef) ta' weraq miżħunn fin ta' eż. ħorrieqa tnigges (*Urtica dioica*), ċawsla (*Morus alba*), silla bajda (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*) jew ta' materjal ieħor tal-pjanti (*Cerophyl* jew ċelluloża alfa).

Kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni

32. Tirwiħ bil-mod tal-ilma ta' fuq f'reċipjenti tat-test ikun ipprovdut preferibbilment 24 siegħat wara li jiżdiedu l-larvi u jitkompla matul it-test kollu (għandha tingħata attenzjoni biex il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul ma tinżilx taħt 60 % ta' ASV). Tirwiħ ikun ipprovdut permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħġieġ imwaħħla 2-3 cm 'il fuq mis-saff tas-sediment (jiġifieri bużżieqa waħda jew ftit tal-ilma/sec). Meta jkunu qed jiġu ttestjati kimiċi volatili, jista' jitqies li s-sistema tas-sediment-ilma ma titrewwaħx.

33. It-test jitmexxa f'temperatura kostanti ta' 20 °C (± 2 °C). Għal *C. tentans* u *C. yoshimatui* t-temperaturi rakkomandati jkunu ta' 23 °C u 25 °C (± 2 °C), rispettivament. Jintuża fotoperjodu ta' 16-il siegħa u l-intensità tad-dawl għandha tkun 500 sa 1 000 lux.

▼M4

Durata tal-espożizzjoni

34. L-espożizzjoni tibda biż-żieda ta' larvi fir-reċipjenti ffortifikati u ta' kontroll. Id-durata massima tal-espożizzjoni tkun ta' 28 jum għal C. riparius u C. yoshimatsui, u 65 jum għal *C. tentans*. Jekk pappamoski jevolvu qabel, it-test jista' jitwaqqaf wara minimu ta' ħamest ijiem wara li jkun evolva l-ewwel adult fil-kontroll.

Osservazzjonijiet

Emerġenza

35. Ikunu ddeterminati ż-żmien ta' żvilupp u l-għadd totali ta' pappamoski rġiel u nisa evoluti għal kollox. L-irġiel ikunu identifikati faċilment mill-antenni tagħhom kollha pjumi.

36. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu osservati mill-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa biex issir valutazzjoni viżiva ta' kull mġiba mhux normali (eż. tluq mis-sediment, għawm mhux tas-soltu), mqabbla mal-kontroll. Matul il-perjodu ta' evoluzzjoni mistennija jkun meħtieġ li jsir għadd kuljum ta' pappamoski li jkunu evolvew għalkollox. Is-sess u l-għadd ta' pappamoski evoluti għalkollox ikunu rreġistrati kuljum. Wara identifikazzjoni l-pappamoski jitneħħew mir-reċipjenti. Kull kwantità ta' bajd iddepożitata qabel ma jintemm it-test għandha tkun irreġistrata u mbagħad titneħħa biex larvi ma jitħallewx jerġgħu jidħlu fis-sediment. Ikun irreġistrat ukoll l-għadd ta' pupae viżibbli li jkunu naqsu li jevolvu. Gwida dwar kejl ta' evoluzzjoni hija pprovduta fl-Appendiċi 5.

Tkabbir u sopravivenza

37. Jekk għandha tkun ippruvduta dejta dwar sopravivenza u tkabbir ta' larvi għal 10 ijiem, għandhom ikunu inklużi reċipjenti addizzjonali tat-test mill-bidu, biex ikunu jistgħu jintużaw wara. Is-sediment minn dawn ir-reċipjenti addizzjonali jintgħarbel billi jintuża għarbiel ta' 250 μm biex iżomm il-larvi. Kriterji għal mewt huma immobbiltà jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimulu mekkaniku. Larvi li ma jkunux irkuprati għandhom jingħaddu wkoll bħala mejtin (larvi li jkunu mietu fil-bidu tat-test setgħu kienu ġew iddegradati minn mikrobi). Ikunu ddeterminat il-piż fin-niexef (mingħajr irmied) tal-larvi li jkunu baqgħu ħajjin għal kull reċipjent tat-test u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent. Ikun utli li jkun iddeterminat ta' liema fażi jkunu l-larvi li jkunu baqgħu ħajjin; għal dak jista' jintuża l-kejl tal-wisa' tal-iskutella tar-ras ta' kull larva.

Kejlijiet analitiċi

Konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar

38. Qabel ma jibda t-test (jiġifieri żieda ta' larvi), jittieħdu kampjuni tas-sediment kollu minn mill-anqas reċipjent wieħed għal kull trattament għad-determinazzjoni analitika tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fis-sediment. Huwa rrakkomandat li, bħala minimu, kampjuni tal-ilma ta' fuq, tal-ilma tal-pori u tas-sediment ikunu analizzati fil-bidu (ara l-paragrafu 24) u fit-tmiem tat-test, fl-ogħla konċentrazzjoni u f'waħda aktar baxxa. Dawn id-determinazzjonijiet ta' konċentrazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar jagħtu tagħrif dwar l-imġiba/il-partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fis-sistema ilma u sediment.

39. Meta jittieħdu kejlijiet intermedji (eż. fis-7 jum) u jekk l-analiżi jkun jeħtieġilha kampjuni kbar li ma jkunux jistgħu jittieħdu minn reċipjenti tat-test mingħajr ma tkun influwenzata s-sistema ta' ttestjar, għandhom isiru determinazzjonijiet analitiċi fuq kampjuni minn reċipjenti addizzjonali tat-test ittrattati bl-istess mod (inkluża l-preżenza ta' organiżmi tat-test) iżda mhux użati għal osservazzjonijiet bijoloġiċi.

▼M4

40. Ċentrifugazzjoni pereżempju ta' 10 000 g u 4 °C għal 30 min. hija l-proċedura rrakkomandata biex ikun iżolat ilma interstizjali. Iżda jekk is-sustanza għall-ittestjar tkun turi li filtri ma jassorbuhiex, tista' wkoll tkun aċċettabbli l-filtrazzjoni. F'xi każijiet jista' ma jkunx possibbli li jkunu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori minħabba li d-daqs tal-kampjun ikun żgħir wisq.

Parametri fiżikokimiċi

41. Il-pH u t-temperatura tat-reċipjenti tat-test għandhom jitkejlu b'mod adatt (ara l-paragrafu 10). Melħ minerali fl-ilma u ammonja għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed tat-test fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fit-tmiem tat-test.

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

42. L-għan ta' dan it-test huwa biex ikun iddeterminat l-effett tas-sustanza għall-ittestjar fuq ir-rata ta' żvilupp u fuq l-għadd totali ta' pappamoski rġiel u nisa evoluti għalkollox, jew fil-każ tal-effetti tat-test ta' 10 ijiem fuq is-sopravivenza u l-piż tal-larvi. Jekk ma jkunx hemm indikazzjonijiet ta' sensitivitajiet differenti statistikament ta' sessi, riżultati dwar irġiel u nisa jkunu jistgħu jinġabru għal analiżi ta' statistika. Id-differenzi ta' sensittività bejn is-sessi jistgħu jkunu ġġudikati statistikament pereżempju b'test ta' tabella χ^2-r x 2. Sopravivenza tal-larvi u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent għandha tkun ikkalkulata wara 10 jiem meta jkun meħtieġ.

43. Konċentrazzjonijiet ta' effetti espressi u bbażati fuq piż fin-niexef huma kkalkulati preferibbilment abbażi ta' konċentrazzjonijiet ta' sediment imkejla fil-bidu tat-test (ara l-pargrafu 38).

44. Biex tkun ikkomputata stima ta' punti għall-EC_{50} jew għal kull EC_x oħra, tista' tintuża statistika għal kull reċipjent bħala replika vera. Biex ikun ikkalkulat intervall ta' kunfidenza għal kull EC_x għandha titqies il-varjabbiltà fost reċipjenti, jew għandu jintwera li din il-varjabbiltà tant tkun żgħira li tista' ma titqisx. Meta l-mudell jitqiegħed minn Least Squares, għandha tkun applikata trasformazzjoni għall-istatistika għal kull reċipjent biex titjieb l-omoġeneità ta' varjanza. Iżda, valuri EC_x għandhom ikunu kkalkulati wara li r-rispons ikun ġie ttrasformat u ttieħed lura għall-valur oriġinali.

45. Meta l-analiżi ta' statistika jkollha l-għan li tiddetermina NOEC/LOEC b'ittestjar ta' ipoteżi, il-varjabbiltà fost reċipjenti jeħtiġilha titqies, eż. b'ANOVA f'aktar stadji. Alternattivament, aktar testijiet robusti (21) jistgħu jkunu adatti f'sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ksur tas-suppożizzjonijiet tas-soltu ta' ANOVA.

Proporzjon ta' evoluzzjoni

46. Proporzjonijiet ta' evoluzzjoni huma dejta alternattiva mhux kontinwa, u jistgħu jkunu analizzati bit-test ta' Cochran-Armitage applikat b'mod devoluttiv fejn tkun mistennija doża-rispons monotonika u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-istennija. Jekk le, jistgħu jintużaw test eżatt ta' Fisher jew dak ta' Mantel-Haenszel b'valuri "p" ta' Bonferroni-Holm aġġustati. Jekk ikun hemm evidenza ta' varjabbiltà akbar bejn replikati fl-istess konċentrazzjoni milli distribuzzjoni binomja tkun tindika (sikwit irriferuta bħala varjazzjoni "extrabinomja"), mbagħad għandhom jintużaw test robust ta' Cochran-Armitage jew dak eżatt ta' Fisher kif propost fi (21).

▼M4

L-għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent, ne, ikun iddeterminat u diviż bl-għadd ta' larvi introdotti, n_a:

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

fejn:

ER = proporzjon ta' evoluzzjoni

n_e = għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent

n_a = għadd ta' larvi introdotti għal kull reċipjent

47. Alternattiva li hija l-aktar adatta għal daqsijiet kbar ta' kampjuni, meta jkun hemm varjanza extrabinomja, hija li l-proporzjon ta' evoluzzjoni jkun ittrattat bħala rispons kontinwu u li jintużaw proċeduri bħat-test Williams meta tkun mistennija doża-rispons monotonika u tkun konsistenti ma' din id-dejta ta' ER. It-test Dunnett ikun adatt fejn il-monotoniċità ma tapplikax. Daqs kbir ta' kampjun huwa ddefinit hawn bħala l-għadd evolut, u l-għadd mhux evolut ukoll ikun aktar minn ħamsa, abbażi ta' kull replika (reċipjent).

48. Biex ikunu applikati metodi ta' ANOVA, valuri ta' ER għandhom l-ewwel ikunu ttrasformati bit-trasformazzjoni arcsin-sqrt jew bit-trasformazzjoni Freeman-Tukey biex tinkiseb distribuzzjoni normali approssimata u biex varjanzi jsiru ugwali. Jistgħu jkunu applikati t-testijiet Cochran-Armitage, dak eżatt ta' Fisher (Bonferroni), jew it-test ta' Mantel-Haenszel meta jintużaw il-frekwenzi assoluti. It-trasformazzjoni arcsin-sqrt tkun applikata billi jittieħed l-inverse sine (sin^{-1}) tal-għerq kwadrat ta' ER.

49. Għal proporzjonijiet ta' evoluzzjoni, valuri EC_x ikunu kkalkulati billi tintuża analiżi ta' rigressjoni (jew eż. probit (22), logit, Weibull, softwer kummerċjali adatt, eċċ.). Jekk analiżi ta' rigressjoni tfalli (eż. meta jkun hemm anqas minn żewġ risponsi parzjali), jintużaw metodi mhux parametriċi oħra bħal medja mobbli jew interpolazzjoni sempliċi.

Rata ta' żvilupp

50. Il-ħin medju ta' żvilupp jirrappreżenta t-tul medju ta' żmien bejn id-dħul ta' larvi (jum 0 tat-test) u l-evoluzzjoni tal-koorti sperimentali ta' pappamoski. (Għall-kalkulazzjoni taż-żmien reali ta' żvilupp, għandha titqies l-età tal-larvi fil-waqt tad-dħul). Ir-rata ta' żvilupp hija r-reċiproka taż-żmien tal-iżvilupp (unità: 1/jum) u tirrappreżenta dik il-parti tal-iżvilupp tal-larva li sseħħ kuljum. Ir-rata ta' żvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar tossiċità ta' sediment minħabba li l-varjanza tagħha hija aktar baxxa, u hija aktar omoġenja u eqreb distribuzzjoni normali kif imqabbla ma' żmien ta' żvilupp. Għalhekk, jistgħu jintużaw proċeduri ta' test parametriku qawwija ma' rata ta' żvilupp milli ma' żmien ta' żvilupp. Għal rata ta' żvilupp bħala reazzjoni kontinwa, jistgħu jkunu stmati valuri EC_x billi tintuża analiżi ta' rigressjoni (eż. (23), (24)).

51. Għat-testijiet ta' statistika li ġejjin, l-għadd ta' pappamoski osservati f'jum ta' spezzjoni x ikunu preżunti li jkunu evolvew fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn jum x u jum x-l (l = tul tal-intervall ta' spezzjoni, is-soltu jum 1). Ir-rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent (x) tkun ikkalkulata skont:

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

▼M4

fejn:

$\bar{x}$: rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent

i: indiċi ta' intervall ta' spezzjoni

m: għadd massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

f_i: għadd ta' pappamoski evoluti fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e: għadd totali ta' pappamoski evoluti fit-tmiem tal-esperiment ($= \sum f_i$)

x_i: rata ta' żvilupp tal-pappamoski evoluti f'intervall i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

fejn:

day_i: jum ta' spezzjoni (jiem minħabba applikazzjoni)

l_i: tul ta' intervall ta' spezzjoni i (jiem, is-soltu jum wieħed)

Rapport tat-test

52. Ir-rapport tat-test għandu mill-anqas jipprovdi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza għall-ittestjar:

— natura fiżika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (solubilità tal-ilma, pressjoni tal-fwar, koeffiċjent tal-partizzjoni fil-ħamrija (jew fis-sediment jekk ikunu disponibbli), stabbiltà fl-ilma, eċċ.);

— dejta ta' identifikazzjoni ta' kimiċi (isem komuni, isem tal-kimika, formula strutturali, Numru tal-CAS, eċċ.) inklużi l-purezza u l-metodu għall-kwantifikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar.

Speċi tat-test:

— annimali użati għat-test: speċi, isem xjentifiku, sors ta' organiżmi u kondizzjonijiet għat-trobbija;

— informazzjoni dwar maniġġar ta' kwantitajiet ta' bajd u larvi;

— l-età tal-annimali tat-test meta jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti tat-test.

Kondizzjonijiet tat-test:

— sediment użat, jiġifieri sediment naturali jew formulat;

— għal sediment naturali, post u deskrizzjoni ta' sit ta' teħid ta' kampjuni ta' sediment, inkluża, jekk ikun possibbli, storja ta' kontaminazzjoni; karatteristiċi: pH, kontenut ta' karbonju organiku, proporzjon ta' C/N u granulometrija (skont kif jixraq).

— tħejjija tas-sediment formulat: ingredjenti u karatteristiċi (kontenut ta' karbonju organiku, pH, rtubija, eċċ. fil-bidu tat-test);

— tħejjija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (konċentrazzjoni tal-ossiġnu, pH, konduttività, melħ minerali fl-ilma, eċċ. fil-bidu tat-test);

— fond tas-sediment u ilma ta' fuq;

— volum tal-ilma ta' fuq u tal-pori; piż ta' sediment imxarrab bi jew mingħajr ilma tal-pori;

▼M4

— reċipjenti tat-test (materjal u daqs);

— metodu ta' fortifikazzjoni ta' sediment: konċentrazzjonijiet ta' testijiet użati, għadd ta' replikati u użu ta' solvent jekk ikun hemm;

— faża ta' ekwilibriju ta' stabbilizzazzjoni tas-sistema ta' sediment-ilma fortifikata: durata u kondizzjonijiet;

— kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni: temperatura, ċiklu ta' dawl u intensità, tirwiħ (frekwenza u intensità);

— informazzjoni dettaljata dwar għalf inkluż tip ta' ikel, tħejjija, ammont u reġim ta' għalf.

Riżultati:

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejla tat-testijiet u r-riżultati tal-analizi kollha biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fir-reċipjent tat-test;

— il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, jiġifieri pH, temperatura, ossiġnu maħlul, melħ minerali fl-ilma u ammonja;

— bdil ta' ilma evaporat tat-test, jekk ikun hemm;

— għadd ta' pappamoski evoluti rġiel u nisa għal kull reċipjent u għal kull jum;

— għadd ta' larvi li jkunu naqsu li jevolvu bħala pappamoski għal kull reċipjent;

— medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent, u għal kull faża, skont il-każ;

— perċentwali ta' evoluzzjoni għal kull replika u konċentrazzjoni tat-test (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);

— rata medja ta' żvilupp ta' pappamoski żviluppati għalkollox għal kull replika u rata ta' trattament (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);

— stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi eż. ECx (u intervalli assoċjati ta' kunfidenza), NOEC u/jew LOEC, u l-metodi ta' statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluża kull influwenza fuq il-konklużjonijiet tar-riżultati tat-testijiet minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

LETTERATURA:

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

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Kanada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ u Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Kanada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Kanada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Test Method C.8 of this Annex, Toxicity for Earthworms.

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a żero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a żero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Għall-fini ta'dan il-Metodu ta' Ttestjar jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sediment ifformulat jew sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku, huwa taħlita ta' materjali li jintużaw biex jimitaw l-komponenti fiżiċi ta' sediment naturali.

Ilma ta' fuq huwa l-ilma li jitqiegħed fuq sediment fir-reċipjent tat-test.

Ilma interstizjali jew ilma tal-pori huwa l-ilma li jokkupa l-ispazju bejn sediment u partiċelli tal-ħamrija.

Sediment fortifikat huwa sediment li miegħu tkun żdiedet sustanza għall-ittestjar.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 2

Rakkomandazzjonijiet għal kultura ta' *Chironomus riparius*

1. Larvi ta' *Chironomus* jistgħu jitkabbru f'dixxijiet ta' kristallizzazzjoni jew f'kontenituri akbar. Ramel fin tal-quartz jitferrex f'saff irqiq ta' madwar 5 as 10 mm fond fuq il-qiegħ tal-kontenitur. Kieselguhr (eż. Merck, Art 8117) ukoll intwera li huwa substrat adatt (saff irqaq ta' sa ftit ħafna mm ikun biżżejjed). Wara jiżdied ilma adattat għal fond ta' diversi cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jimtlew kull meta huwa meħtieġ biex jieħdu post it-telf li jirriżulta mill-evaporazzjoni, u jkun ta' repevenzjoni kontra d-dessekazzjoni. L-ilma jista' jinbidel jekk ikun meħtieġ. Għandu jkun ipprovdut tirwiħ bil-mod. Ir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi għandhom jinżammu f'gaġġa apposta li ma tħallix li l-adulti li jkunu qed jevolvu jaħarbu. Il-gaġġa għandha tkun kbira biżżejjed biex adulti evoluti ma jitħallewx jimirħu fi qtajja kbar, għax inkella tista' ma ssirx kopulazzjoni (il-minimu huwa ta' madwar 30 x 30 x 30 cm).

2. Gaġeġ għandhom jinżammu f'temperatura ambjentali jew f'kamra ambjentalment kostanti ta' 20 + 2 °C b'perjodu fotografiku ta' 16-il siegħa dawl (intensità madwar 1 000 lux), 8 sigħat dlam. Kien irrapportat li umdità tal-arja ta' anqas minn 60 % RH tista' tfixkel ir-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuża kull ilma tajjeb naturali jew sintetiku. Komunement jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit li jkun tneħħielu l-kloru u midja artifiċjali (eż. il-midjum Elendt "M4" jew "M7", ara hawn taħt). L-ilma għandu jitrewwaħ qabel ma jintuża. Jekk ikun meħtieġ, l-ilma tal-kultura jista' jiġġedded billi l-ilma użat jitferra' jew jgħaddi minn ġo sifun minn reċipjenti ta' kultura b'attenzjoni mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larvi.

Tmigħ tal-larvi

4. Larvi ta' *Chironomus* għandhom jintemgħu ikel ta' trofof tal-ħut (TetraMin®, TetraPhyll® jew marka simili oħra ta' ikel tal-ħut proprjetarju), f'bejn wieħed u ieħor 250 mg għal kull reċipjent kuljum. Dan jista' jingħata bħala trab mitħun niexef jew bħala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ta' ikel ta' trofof jiżdied ma' 20 ml ta' ilma ta' dilwizzjoni u jitħallat biex jagħti taħlita omoġenja. Din it-tħejjija tista' tintema' f'rata ta' madwar 5 ml għal kull reċipjent kuljum (ixxejkja qabel ma tuża). Larvi li jkollhom aktar żmien jistgħu jirċievu aktar.

5. It-tmigħ jista' jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum ta' kultura "jissaħħab", it-tmigħ għandu jitnaqqas. Żidiet ta' ikel għandhom ikunu mmonitorjati b'attenzjoni. Ikel mill-anqas jikkawża tluq tal-larvi lejn il-kolonna tal-ilma, u ħafna ikel jikkawża aktar attività mikrobika u konċentrazzjonijiet tal-ossiġnu mnaqqsin. Iż-żewġ kondizzjonijiet jistgħu jġibu magħhom rati ta' tkabbir imnaqqas.

6. Xi ċelluli ta' alka ħadra (eż. Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris) jistgħu wkoll jiżdiedu meta jitqiegħdu f'reċipjenti ġodda ta' kultura.

Tmigħ ta' adulti evoluti

7. Xi wħud minn dawk li jagħmlu esperimenti ssuġġerew li kuxxinett tat-tajjar mgħaddas f'soluzzjoni saturata tas-sukrożju jista' jservi ta' ikel għal adulti evoluti.

▼M4

Emerġenza

8. F’20 + 2 °C adulti jibdew jevolvu mir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi wara bejn wieħed u ieħor 13 - 15-il jum. L-irġiel jintgħarfu malajr għax ikollhom antenni kollha pjumi.

Kwantitajiet ta’ bajd

9. Malli l-adulti jkunu fil-gaġġa tat-trobbija, ir-reċipjenti kollha għat-tkabbir tal-larvi għandhom ikunu eżaminati tliet darbiet fil-ġimgħa għal tqegħid ta’ kwantitajiet ta’ bajd qisu ġelatina. Jekk ikun hemm, il-kwantitajiet ta’ bajd għandhom jitneħħew b’attenzjoni. Il-bajd għandu jkun ittrasferit għal ġo dixx żgħir li jkun fih kampjun tal-ilma tat-trobbija. Kwantitajiet ta’ bajd jintużaw biex jinbeda reċipjent ġdid ta’ kultura (eż. 2 - 4 kwantitajiet ta’ bajd/reċipjent) jew biex jintużaw għal testijiet tat-tossiċità.

10. Larvi tal-ewwel fażi għandhom ifaqqsu wara 2 - 3 ijiem.

Reċipjenti ġodda ta’ kultura

11. Malli jkunu stabbiliti kulturi għandu jkun possibbli li jitqiegħed reċipjent ġdid ta’ kultura tal-larvi kull ġimgħa jew anqas ta’ spiss skont ħtiġijiet ta’ ttestjar, billi jitneħħew ir-reċipjenti aktar qodma wara li jkunu evolvew pappamoski adulti. Bl-użu ta’ din is-sistema jkun hemm provvista regolari ta’ adulti b’anqas maniġġar.

Tħejjija ta’ soluzzjonijiet tat-testijiet “M4” and “M7”

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midjum “M4”. Il-midjum “M7” jitħejja bħala l-midjum “M4” ħlief għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom konċentrazzjonijiet ikunu erba’ darbiet aktar baxxi f’“M7” milli f’“M4”. Qed titħejja pubblikazzjoni dwar il-midjum “M7” (Elendt, komunikazzjoni personali). Is-soluzzjoni tat-test ma għandhiex tkun ippreparata skont Elendt u Bias (1990) għall-konċentrazzjonijiet ta’ NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 u K2HPO4 mogħtija għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet stokk mhumiex adegwati.

Tħejjija tal-midjum “M7”

13. Kull soluzzjoni ta’ stokkijiet (I) titħejja waħda waħda u soluzzjoni ta’ stokkijiet flimkien (II) titħejja minn dawn is-soluzzjonijiet ta’ stokkijiet (I) (ara Tabella 1). Ħamsin ml mis-soluzzjoni ta’ stokkijiet flimkien (II) u l-ammonti ta’ kull soluzzjoni ta’ stokkijiet ta’ makronutrijenti li jidhru fit-Tabella 2 ikunu 1 litru ta’ ilma dejonizzat biex jitħejja l-midjum “M7”. Titħejja soluzzjoni ta’ stokkijiet ta’ vitamini billi jiżdiedu tliet vitamini mal-ilma dejonizzat kif indikat fit-Tabella 3, u jiżdied 0,1 ml tas-soluzzjoni ta’ stokkijiet flimkien ta’ vitamini mal-midjum “M7” finali ftit qabel ma jintuża. (Is-soluzzjoni ta’ stokkijiet ta’ vitamini tinħażen iffriżata f’alikwoti żgħar). Il-midjum jitrewwaħ u jkun stabbilizzat.

LETTERATURA:

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

▼**M4**

Tabella 1

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' mikroelementi għall-midjum M4 u M7

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I)	Ammont (mg) magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): ħallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u agħmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dawn is-sustanzi huma differenti f'M4 u f'M7, kif indikat hawn taħt.
(2) Dawn is-soluzzjonijiet jitħejjew waħda waħda, mbagħad jitferrgħu flimkien u jiġu pproċessati minnufih f'awtoklav (reċipjent li jingħalaq awtomatikament).

Tabella 2

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' makronutrijenti għall-midjum M4 u M7

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' makronutrijenti miżjudin biex jitħejja midjum M4 and M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabella 3

Soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini għall-midjum M4 u M7. It-tliet soluzzjonijiet kollha ta' vitamini jingħaqdu flimkien biex jagħmlu soluzzjoni waħda ta' stokkijiet ta' vitamini.

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini miżjudin biex jitħejja midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tijamina	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

LETTERATURA

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendiċi 3

THEJJIJA TA' SEDIMENT FORMULAT

Kompożizzjoni tas-sediment

Il-kompożizzjoni tas-sediment formulat għandha tkun kif ġej:

Kostitwent	Karatteristiċi	% ta' sediment piż fin-niexef
Pit	Pit ta' ħażiż Sphagnum, qrib kemm jista' jkun ta' pH 5,5-6,0 mingħajr ma tibqa' tidher il-pjanta, miħun fin (partiċelli ta' daqs ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja	4 - 5
Ramel tal-quartz	Daqs ta' ramla: > 50 % tal-partiċelli għandhom ikunu fil-firxa ta' 50-200 µm	75 - 76
Tafal tal-kawlina	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %	20
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda ta' pit u ramel	2 (± 0,5)
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$,pulverizzat, kemikament pur	0,05 - 0,1
Ilma	Konduttività ≤ 10 µS/cm	30 - 50

Thejjija

Il-pit jitnixxef bl-arja u jintaħan fi trab fin. Titħejja sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat billi jintuża apparat ta' omoġeneizzazzjoni ta' prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni jiġi aġġustat sa 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni tiġi kkondizzjonata għal mill-anqas jumejn billi titħawwad bil-mod f'20 ± 2 °C, biex il-pH isir stabbli u jistabbilixxi komponent mikrobiku stabbli. Il-pH jerġa' jitkejjel u għandu jkun 6,0 ± 0,5. Mbagħad is-sospensjoni tal-pit titħallat mal-kostitwenti l-oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ma' ilma dejonizzat biex jinkiseb sediment omoġenju b'kontenut ta' ilma f'firxa ta' 30-50 % tal-piż fin-niexef tas-sediment. Il-pH tat-taħlita finali jerġa' jitkejjel għal darb'oħra u jiġi aġġustat għal 6,5 sa 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun meħtieġ. Jittieħdu kampjuni tas-sediment biex ikun iddeterminat il-piż fin-niexef u l-kontenut ta' karbonju organiku. Mbagħad, qabel ma jintuża fit-test tat-tossiċità tal-kironomidi, huwa rrakkomandat li s-sediment formulat ikun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taħt l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti.

Ħżin

Il-kostitwenti nixfin għat-thejjija tas-sediment artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post niexef u frisk f'temperatura ambjentali. Is-sediment formulat (mxarrab) m'għandux jinħażen qabel ma jsir użu minnu fit-test. Għandu jintuża minnufih wara l-perjodu ta' kondizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-thejjija tiegħu.

LETTERATURA:

Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness. Tossiċità għal Ħniex.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Appendiċi 4

Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettbbli

Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja partikulata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 µg/l
Ebusija bħala $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Kloru residwali	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforuż totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloriċi totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

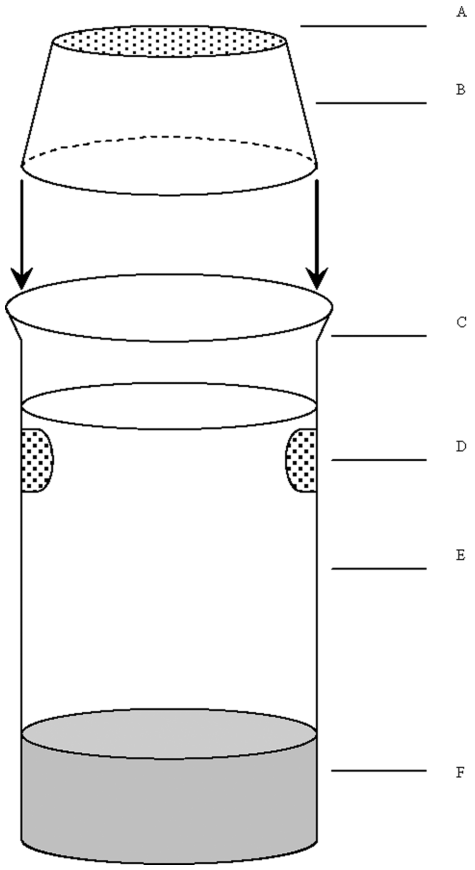
(*) Iżda għandu jkun innotat li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni).

▼**M4**

Appendiċi 5

Gwida għall-monitoraġġ tal-evoluzzjoni ta' larvi kironomidi

Sifuni ta' evoluzzjoni jitqiegħdu fuq il-bekkijiet tat-test. Dawn is-sifuni jkunu meħtieġa mill-20 jum sa meta jintemm it-test. Eżempju ta' sifun li jintuża huwa pinġut hawn taħt:



A: l-iskrijn tan-nylon

B: il-kikkri tal-plastik maqluba

C: il-bekk ta' espożizzjoni mingħajr xoffa

D: il-portijiet tal-iskrijn li jibdlu l-ilma

E: ilma

F: sediment

▼M4

C.28. TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA BL-UŻU TA' ILMA FORTIFIKAT

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għat-TG tal-OECD 219 (2004). Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex jivvaluta l-effetti ta' espożizzjoni prolongata tal-kimiċi għal-larva li tgħix fis-sediment tad-dipteran tal-ilma ħelu *Chironomus* sp. Huwa primarjament ibbażat fuq il-linja gwida BBA li tuża sistema tat-test sediment-ilma bil-ħamrija artifiċjali, u x-xenarju ta' espożizzjoni tal-kolonna tal-ilma (1). Iqis ukoll protokolli eżistenti ta' testijiet tat-tossiċità għal *Chironomus riparius* u *Chironomus tentans* li kienu żviluppati fl-Ewropa u fl-Amerika ta' Fuq (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) u kienu ring-tested (1)(6)(9). Jistgħu jintużaw ukoll speċijiet oħra ta' kironomidi iddokumentati sewwa, eż. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Ix-xenarju ta' espożizzjoni użat f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ta' ilma fortifikat. L-għażla tax-xenarju adatt ta' espożizzjoni tiddependi mill-applikazzjoni maħsuba tat-test. Ix-xenarju ta' espożizzjoni għall-ilma, li jinvolvi kolonna fortifikata ta' ilma, huwa maħsub li jkun jixbah sprej ta' pestiċidi meta jgħaddi mal-kurrent, u jkopri l-konċentrazzjonijiet meta fil-bidu jilħqu l-aqwa tagħhom f'ilma tal-pori. Huwa wkoll utli għal tipi oħra ta' espożizzjoni (inkluż tixrid kimiku) ħlief għal proċessi ta' akkumulazzjoni li jdumu aktar mill-perjodu tat-test.

3. Sustanzi li jeħtiġilhom ikunu ttestjati għal organiżmi li jgħixu f'sediment is-soltu jippersistu f'dan il-kompartiment tul perjodi twal ta' żmien. L-organiżmi li jgħixu f'sediment jistgħu jkunu esposti permezz ta' għadd ta' rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni u taż-żmien meħud għal kull waħda biex tikkontribwixxi għall-effetti tossiċi globali, tiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika konċernata. Għal sustanzi li jassorbixxu ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5) jew għal sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-inġestjoni ta' ikel kontaminat tista' tkun rotta sinifikanti ta' espożizzjoni. Biex it-tossiċità ta' sustanzi lipofiliċi ħafna ma tkunx sottovalutata, jista' jitqies l-użu ta' ikel miżjud mas-sediment qabel l-applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar. Biex jittieħdu r-rotot potenzjali kollha ta' espożizzjoni l-fokus ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar ikun fuq espożizzjoni fit-tul. It-testijiet idumu madwar 20 - 28 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u 28 - 65 jum għal *C. tentans*. Jekk tkun meħtieġa dejta għal żmien qasir għal għan speċifiku, pereżempju biex ikunu mistħarrġa l-effetti ta' kimiċi instabbli, replikati addizzjonali jistgħu jitneħħew wara perjodu ta' għaxart ijiem.

4. Il-punti ta' tmiem imkejla huma l-għadd totali ta' adulti li jkunu evolvew u ż-żmien li jkunu ħadu biex evolvew. Huwa rrakkomandat li l-kejl tas-sopravivenza u tat-tkabbir tal-larvi għandu jsir biss wara perjodu ta' għaxart ijiem jekk tkun meħtieġa dejta addizzonali għal żmien qasir, billi jintużaw replikati addizzjonali skont il-każ.

5. Huwa rrakkomandat l-użu ta' sediment formulat. Sediment formulat għandu diversi vantaġġi fuq sedimenti naturali:

— il-varjabbiltà sperimentali titnaqqas minħabba li jifforma "matriċi standardizzata" riproduċibbli u l-ħtieġa li jinstabu sorsi ta' sediment mhux kontaminati u nodfa tkun eliminata;

— it-testijiet jistgħu jibdew f'kull żmien mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà staġonali fis-sediment tat-test u ma jkunx hemm ħtieġa li s-sediment ikun ittrattat minn qabel biex titneħħa fawna indiġena; l-użu ta' sediment formulat inaqqas ukoll l-ispiża b'rabta mal-ġabra mill-post ta' ammonti suffiċjenti ta' sediment għal testijiet ta' rutina;

▼M4

— l-użu ta’ sediment formulat jippermetti li jsiru tqabbiliet ta’ tossiċità u gradazzjoni ta’ sustanzi b’dan il-mod: dejta dwar tossiċità minn testijiet b’sediment naturali u artifiċjali kienet komparabbli għal diversi kimiċi (2).

6. Definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel fażi ta’ larvi kironomidi jkunu esposti għal firxa ta’ konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f’sistemi ta’ sediment-ilma. It-test jibda billi l-larvi tal-ewwel fażi jitqiegħdu fil-bekkijiet tat-test li jkun fihom is-sistema ta’ sediment-ilma u sussegwentement is-sustanza għall-ittestjar tiġi ffortifikata mal-ilma. Ir-rata ta’ evoluzzjoni u żvilupp ta’ kironomidi titkejjel fit-tmiem tat-test. Is-sopravivenza u l-piż tal-larvi jistgħu jitkejlu wkoll wara 10 ijiem jekk ikun meħtieġ (billi jintużaw replikati addizzjonali skont kif ikun xieraq). Din id-dejta tkun analizzata jew billi jintuża mudell ta’ rigressjoni biex tkun stmata l-konċentrazzjoni li għandha tikkawża x % tnaqqis fl-evoluzzjoni, fis-sopravivenza jew fit-tkabbir tal-larvi (eż. EC_{15}, EC_{50}, eċċ.), jew billi jintuża ttestjar ta’ ipoteżi ta’ statistika biex ikun iddeterminat NOEC/LOEC. Dan tal-aħħar ikun jeħtieġlu tqabbil ta’ valuri ta’ effett ma’ valuri ta’ kontroll billi jintużaw testijiet ta’ statistika.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA GĦALL-ITTESTJAR

8. Is-solubilità fl-ilma tas-sustanza għall-ittestjar, il-pressjoni tal-fwar tagħha, il-partizzjoni mkejla jew ikkalkulata f’sediment u l-istabbiltà fl-ilma u fis-sediment għandhom ikun magħrufin. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f’ilma ta’ fuq, f’ilma tal-pori u f’sediment b’akkuratezza magħrufa u rrapportata u b’limitu ta’ detezzjoni. Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali u l-purezza tas-sustanza għall-ittestjar. Dak li jiġrilha kimikament is-sustanza għall-ittestjar (eż. tixrid, degradazzjoni abijotika u bijotika, eċċ.) ukoll huwa informazzjoni utli. Aktar gwida għall-ittestjar ta’ sustanzi bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluha diffiċli għalihom li jsirilhom it-test tingħata fi (12).

KIMIĊI TA’ REFERENZA

9. Kimiċi ta’ referenza jistgħu jkunu ttestjati perjodikament bħala mezz li jiżgura li l-protokoll tat-test u l-kondizzjonijiet tat-test ikunu affidabbli. Eżempji ta’ sustanzi tossiċi ta’ referenza użati b’suċċess f’ring-tests u fi studji ta’ validazzjoni huma: lindane, trifluralin, pentaklorofenol, klorur tal-kamdju u klorur tal-potassju. (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDITÀ TAT-TEST

10. Biex it-test ikun validu japplikaw il-kondizzjonijiet li ġejjin:

— l-evoluzzjoni fil-kontrolli għandha tkun mill-anqas 70 % fit-tmiem tat-test. (1)(6);

— l-evoluzzjoni ta’ *C. riparius* u *C. yoshimatsui* għal adulti minn reċipjenti ta’ kontroll għandha sseħħ bejn 12 u 23 jum wara li jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti; għal *C. tentans*, ikun meħtieġ perjodu ta’ 20 sa 65 jum.

— fit-tmiem tat-test, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul għandhom jitkejlu f’kull reċipjent. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu għandha tkun mill-anqas 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV) fit-temperatura użata, u l-pH tal-ilma ta’ fuq għandu jkun fil-firxa ta’ 6-9 fir-reċipjenti kollha tal-ittestjar;

▼M4

— it-temperatura tal-ilma mhux suppost tkun differenti b'iktar minn ± 1,0 °C. It-temperatura tal-ilma tista' tkun ikkontrollata b'kamra iżotermika u f'dak il-każ it-temperatura tal-kamra għandha tkun ikkonfermata f'intervall xierqa ta' ħin.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Reċipjenti tat-test

11. L-istudju jitmexxa f'bekkijiet tal-ħġieġ ta' 600 ml b'dijametru qies ta' 8 cm. Reċipjenti oħra jkunu tajbin, iżda għandhom jiggarantixxu fond sewwa tal-ilma ta' fuq u tas-sediment. Il-wiċċ tas-sediment għandu jkun suffiċjenti biex jipprovdi 2 sa 3 cm^2 għal kull larva. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tas-sediment mal-fond tal-ilma ta' fuq għandu jkun 1:4. Reċipjenti tat-test u apparat ieħor li jiġu f'kuntatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kollha mill-ħġieġ jew minn materjal ieħor kimikament inerti (eż. Teflon).

Għażla ta' speċi

12. L-ispeċi li għandha tintuża fit-test preferibbilment hija *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* hija adatta wkoll iżda aktar diffiċli biex tkun ittrattata u jeħtiġilha perjodu itwal ta' test. Tista' tintuża wkoll *Chironomus yohimatsui*. Dettalji ta' metodi ta' kultura jingħataw fl-Appendiċi 2 għal *Chironomus riparius*. Informazzjoni dwar kondizzjonijiet ta' kultura hija wkoll disponibbli għal speċijiet oħra, jiġifieri għal *Chironomus tentans* (4) u *Chironomus yoshimatsui* (11). L-identifikazzjoni ta' speċijiet għandha tkun ikkonfermata qabel l-ittestjar iżda ma tkunx meħtieġa qabel kull test jekk organiżmi jkunu ġejjin minn kultura interna.

Sediment

13. Preferibbilment għandu jintuża sediment formulat (msejjaħ ukoll sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Iżda, jekk jintuża sediment naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (huma wkoll irrakkomandati mill-anqas pH, kontenut ta' karbonju organiku, determinazzjoni ta' parametri oħra bħal proporzjon ta' C/N u granulumetrija), u għandu jkun ħieles minn kull kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu ma', jew jikkunsmaw lill-kironomidi. Huwa wkoll irrakkomandat li, qabel ma jintuża f'test tat-tossiċità tal-kironomidi, is-sediment naturali jkun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taħt l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti. Huwa rrakkomandat li f'dan it-test jintuża s-sediment formulat li ġej, ibbażat fuq il-ħamrija artifiċjali użata fil-Metodu ta' Ttestjar C.8 (14) (1)(15)(16):

(a) 4-5 % pit (piż fin-niexef): qrib kemm jista' jkun pH 5,5 sa 6,0; huwa importanti li jintuża pit f'għamla ta' trab, miħun fin (partiċelli ta' daqs ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja biss.

(b) 20 % tafal tal-kawlina (piż fin-niexef) (kontenut ta' kawlina preferibbilment aktar minn 30 %).

(c) 75-76 % ramel tal-quartz (piż fin-niexef) (għandu jippredomina ramel fin b'aktar minn 50 % tal-partiċelli bejn 50 u 200 μm).

(d) jiżdied ilma dejonizzat biex jinkiseb kontenut ta' rtuba tat-taħlita finali f'firxa ta' 30 - 50 %.

(e) Karbonat tal-kalċju ta' kwalità kemikament pura ($CaCO_3$) jiżdied, aġġusta l-pH tat-taħlita finali tas-sediment għal 7,0 ± 0,5.

(f) Il-kontenut ta' karbonju organiku tat-taħlita finali għandu jkun 2 % (± 0,5 %) u għandu jkun aġġustat b'ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

▼M4

14. Is-sors tal-pit, tafal tal-kawlina u ramel għandha tkun magħrufa. Il-komponenti tas-sediment għandhom ikunu eżaminati għan-nuqqas ta' kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti tal-organokloru, komposti organofosforużi, eċċ.). Eżempju għat-tħejjija tas-sediment formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-taħlit ta' kostitwenti nixfin ikun ukoll aċċettabbli jekk jintwera li wara li jkun żdied l-ilma ta' fuq ma sseħħx separazzjoni tal-kostitwenti tas-sediment (eż. biċċiet tal-pit fil-wiċċ tal-ilma), u li l-pit jew is-sediment ikunu kkondizzjonati b'mod suffiċjenti.

Ilma

15. Kull ilma li jkun konformi mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma dilwit b'mod aċċettabbli kif elenkat fl-Appendiċijiet 2 u 4 ikun tajjeb bħala ilma tat-test. Kull ilma tajjeb, ilma naturali (ilma tal-wiċċ jew ta' taħt l-art), ilma rikostitwit (ara l-Appendiċi 2) jew ilma tal-vit li jkun tneħħielu l-kloru jkun aċċettabbli bħala ilma ta' kultura u ilma tat-test jekk kironomidi jibqgħu jgħixu fih sakemm idumu l-kultura u t-testjar mingħajr ma juru sinjal ta' stress. Fil-bidu tat-test, il-pH tal-ilma tat-test għandu jkun bejn 6 u 9 u t-total ta' melħ minerali fl-ilma ma jkunx ogħla minn 400 mg/l bħala $CaCO_3$. Iżda, jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għal-hekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni). Għandu jintuża l-istess tip ta' ilma tul l-istudju kollu. Il-karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma elenkati fl-Appendiċi 4 għandhom jitkejlu mill-anqas darbtejn fis-sena jew meta jkun hemm suspett li dawn il-karatteristiċi jkunu setgħu nbidlu b'mod sinifikanti.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet - Ilma fortifikat

16. Konċentrazzjonijiet ta' testijiet ikunu kkalkulati abbażi ta' konċentrazzjonijiet ta' kolonni ta' ilma, jiġifieri tal-ilma ta' fuq is-sediment. Soluzzjonijiet tat-testijiet tal-konċentrazzjoni magħżula s-soltu jitħejjew b'dilwizzjoni ta' soluzzjoni ta' stokkijiet. Soluzzjonijiet ta' stokkijiet għandhom preferibbilment jitħejjew billi s-sustanza għall-ittestjar tinħall fil-midjum għall-ittestjar. F'xi każijiet jista' jkun meħtieġ l-użu ta' solventi jew aġenti ta' tixrid biex tkun prodotta soluzzjoni ta' stokkijiet konċentrata b'mod adatt. Eżempji ta' solventi adatti huma aċetun, etanol, metanol, etere monoelitiku tal-glikol tal-etilen, etere tad-dimentil tal-glikol tal-etilen, formamidi tad-dimentil u glikol tat-trietilen. Aġenti ta' tixrid li jistgħu jintużaw huma Cremophor RH40, Tween 80, ċelluloża tal-metil 0,01 % u HCO-40. Il-konċentrazzjoni ta' aġent ta' solubilità fil-midjum tal-ittestjar finali għandu jkun minimali (i.e. $\leq$ 0.,1 ml/l) u għandu jkun l-istess fit-trattamenti kollha. Meta jintuża aġent ta' solubilità, m'għandux ikollu effetti sinifikanti fuq sopravivenza jew effett ħażin viżibbli fuq il-larvi kironomidi kif ikun żvelat minn kontroll ta' solventi biss. Iżda għandu jsir kull sforz biex l-użu ta' dawn il-materjali jkun evitat.

DISINN TAT-TEST

17. Id-disinn tat-test jirrelata mal-għażla tal-għadd u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-testijiet, mal-għadd ta' reċipjenti għal kull konċentrazzjoni u mal-għadd ta' larvi għal kull reċipjent. Huma deskritti disinji għal stima ta' punti ta' EC, għal stima ta' NOEC u biex jitmexxa test ta' limitu. L-analiżi b'rigressjoni hija ppreferuta mill-approċċ ta' ttestjar ta' ipoteżi.

Disinn għal analiżi b'rigressjoni

18. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC_{15}, EC_{50}) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom jingħaqdu bil-konċentrazzjonijiet inklużi fit-test. Ġeneralment, l-akkuratezza u l-aktar il-validità, li bihom ikunu jistgħu jsiru stimi ta' konċentrazzjonijiet ta' effetti (EC_x), titjieb meta l-konċentrazzjoni ta' effetti tkun fil-firxa ta'

▼M4

konċentrazzjonijiet ittestjati. Estrapolazzjoni ħafna taħt il-konċentrazzjoni pożittiva l-aktar baxxa jew 'il fuq mill-ogħla konċentrazzjoni għandha tkun evitata. Test preliminari biex jinstabu firxiet ikun utli biex tintgħażel il-firxa ta' konċentrazzjonijiet li jkollhom jintużaw (ara l-paragrafu 27)).

19. Jekk għandu jkun stmat EC_x, għandhom ikunu ttestjati mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet u tliet replikati għal kull konċentrazzjoni. Fi kwalunkwe każ, huwa rrakkomandat li jintużaw konċentrazzjonijiet suffiċjenti ta' testijiet biex titħalla ssir stima tajba ta' mudell. Il-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet meta l-kurva ta' rispons għad-doża jkollha anglu baxx). L-għadd ta' replikati f'kull trattament jista' jitnaqqas jekk l-għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti jiżdied. Iż-żieda fl-għadd ta' replikati jew it-tnaqqis fit-tul tal-intervalli tal-konċentrazzjoni tat-test jittendu li jwasslu għal intervall idjaq ta' kunfidenza għat-test. Ikunu meħtieġa replikati addizzjonali jekk għandhom ikunu stmati s-sopravivenza u t-tkabbir tal-larvi għal 10-ijiem.

Disinn għal stima ta' NOEC/LOEC

20. Jekk għandhom ikunu stmati LOEC jew NOEC, għandhom jintużaw ħames konċentrazzjonijiet tat-test b'mill-anqas erba' replikati u l-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn. L-għadd ta' replikati għandu jkun suffiċjenti biex tkun żgurata qawwa adegwata ta' statistika biex tinkixef differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikat ta' 5 % ($p = 0,05$). Bir-rata ta' żvilupp, Analiżi ta' Varjanza (ANOVA) is-soltu tkun adatta, bħat-test Dunnett u t-test Williams (17)(18)(19)(20). Fil-proporzjon ta' evoluzzjoni jistgħu jkunu użati t-testijiet Cochran-Armitage, dak eżatt ta' Fisher (bil-korrezzjoni ta' Bonferroni), jew ta' Mantel-Haenszel.

Test ta' limitu

21. Ikun jista' jsir test ta' limitu (konċentrazzjoni ta' test wieħed u kontroll) jekk ma jkun osservat ebda effett fit-test preliminari ta' detezzjoni ta' firxa. L-għan tat-test ta' limitu huwa li jkun indikat li l-valur tossiku tas-sustanza għall-ittestjar ikun akbar mill-konċentrazzjoni ta' limitu ttestjata. F'dan il-Metodu ta' Ttestjar ma jistax isir suġġeriment għall-konċentrazzjoni rakkomandata; dan jitħalla fil-ġudizzju tar-regolatur. Is-soltu jkunu meħtieġa mill-anqas sitt replikati kemm għat-trattament kif ukoll għall-kontroll. Għandha tintwera qawwa adegwata ta' statistika biex tinkixef differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikat ta' 5 % ($p = 0,05$). B'rispons metriku (rata ta' żvilupp u piż), it-t-test huwa metodu ta' statistika adatt jekk dejta tissodisfa l-ħtiġijiet ta' dan it-test (normalità, varjanzi omoġenji). Jista' jintuża t-t-test ta' varjanza inugwali jew test mhux parametriku, bħat-test Wilcoxon-Mann-Whithey, jekk dawn il-ħtiġijiet ma jkunux sodisfatti. Bil-proporzjon ta' evoluzzjoni, it-test eżatt ta' Fisher ikun adatt.

PROĊEDURA

Kondizzjonijiet ta' espożizzjoni

Tħejjija ta' sistema ta' ilma u sediment fortifikati

22. Ammonti adatti ta' sediment formulat (ara l-paragrafi 13-14 u Appendiċi 3) jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test biex jifformaw saff ta' mill-anqas 1,5 cm. L-ilma jiżdied għal fond ta' 6 cm (ara paragrafu 15). Il-proporzjon tal-fond tas-saff tas-sediment u l-fond tal-ilma ma għandux jaqbeż 1:4 u s-saff tas-sediment ma għandux ikun iktar fond minn 3 cm. Is-sistema sediment-ilma għandha titħalla taħt tirwiħ ġentitli għal sebat ijiem qabel iż-żieda tal-organiżmi tat-test (ara l-paragrafu 14 u l-Appendiċi 3). Biex ikunu evitati separazzjoni ta' ingredjenti tas-sediment u sospensjoni mill-ġdid ta' materjal fin matul iż-żieda ta' ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, is-sediment jista' jitgħatta b'diska tal-plastik waqt li jkun qed jitferra' ilma fiha, u d-diska titneħħa minnufih wara. Apparati oħra jistgħu wkoll ikunu adatti.

▼M4

23. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu mgħottijin (eż. bi platti tal-ħġieġ). Jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju l-ilma jimtela sal-livell tal-volum oriġinali biex dan jagħmel tajjeb għall-evaporazzjoni tal-ilma. Dan għandu jsir billi jintuża ilma distillat jew dejonizzat biex ma jitħalliex jiżdied melħ.

Żieda ta' organiżmi tat-test

24. Minn erba' sa ħamest ijiem qabel ma l-organiżmi tat-test jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test, għandhom jittieħdu kwantitajiet ta' bajd mill-kulturi u jitqiegħdu f'reċipjenti żgħar f'midjum ta' kulturi. Jista' jintuża midjum qadim mill-kultura ta' stokkijiet jew midjum li jkun għadu kif tħejja. Jekk jintuża dan tal-aħħar, ammont żgħir ta' ikel eż. alka ħadra u/jew ftit qatriet żgħar ta' filtrat minn sospensjoni mitħuna fin ta' trofof ta' ikel tal-ħut għandu jiżdied mal-midjum tal-kultura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss kwantijiet ta' bajd miġbur frisk. Normalment, il-larvi jibdew ifaqqsu ftit jiem wara li jkun hemm il-bajd (2 sa 3 ijiem għal *Chironomus riparius* f'20 °C u 1 sa 4 ijiem għal *Chironomus tentans* fi 23 °C u *Chironomus yoshimatui* fi 25 °C) u jkun hemm tkabbir ta' larvi f'erba' fażijiet, kull faži ddum 4-8 ijiem. Fit-test għandhom jintużaw larvi tal-ewwel faži (2-3 jew 1-4 ijiem wara li jkunu faqqsu). Il-faži ta' pappamoski tista' possibbilment tkun ivverifikata billi jintuża l-wisa' tal-iskutella tar-ras (6).

25. Għoxrin larvi tal-ewwel faži jkunu allokati kif jinzertaw lil kull reċipjent tat-test li jkun fih is-sediment imħallat u l-ilma, billi tintuża pipetta mingħajr ponta. It-tirwiħ tal-ilma għandu jieqaf waqt li l-larvi jkunu qed jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test u jibqa' hekk għal 24 siegħa oħra wara li jkunu żdiedu l-larvi (ara l-paragrafi 24 u 32). Skont it-tifsila tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), l-għadd ta' larvi użati għal kull konċentrazzjoni jkun mill-anqas 60 għall-istima ta' punti ta' EC u 80 għal determinazzjoni ta' NOEC.

26. Erbgħa u għoxrin siegħa wara li jkunu żdiedu l-larvi, is-sustanza għall-ittestjar titħallat fil-kolonna tal-ilma fuq, u jerġa' jingħata tirwiħ. Ikunu applikati volumi żgħar ta' soluzzjonijiet ta' sustanzi għall-ittestjar taħt il-wiċċ tal-ilma billi tintuża pipetta. L-ilma ta' fuq għandu mbagħad jitħallat b'attenzjoni biex is-sediment ma jitħarbatx.

Konċentrazzjonijiet tat-test

27. Test ta' detezzjoni ta' firxa jista' jkun utli biex tkun iddeterminata l-firxa ta' konċentrazzjonijiet għat-test definittiv. Għal dan il-għan tintuża serje ta' konċentrazzjonijiet spazjati fil-wisa' tas-sustanza għall-ittestjar. Biex tkun ipprovduta l-istess densità tal-wiċċ għal kull kironomidu, li jkollu jintuża għat-test definittiv, kironomidi jkunu esposti għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar għal perjodu li jippermetti stima ta' konċentrazzjonijiet adatti ta' testijiet, u ma jkunx hemm ħtieġa ta' replikati.

28. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għat-test definittiv ikunu deċiżi abbażi tar-riżultat tat-test ta' detezzjoni ta' firxa. Mill-anqas għandhom jintużaw u jintgħażlu ħames konċentrazzjonijiet kif deskritt fil-paragrafi 18 sa 20.

Kontrolli

29. Reċipjenti ta' kontroll mingħajr sustanza għall-ittestjar iżda li jkunu jinkludu sediment għandhom ikunu inklużi fit-test bl-għadd xieraq ta' replikati (ara l-paragrafi 19-20). Jekk ikun intuża solvent għal applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar (ara l-paragrafu 16), għandu jiżdied kontroll ta' solvent ta' sediment.

▼M4

Sistema ta' ttestjar

30. Jintużaw sistemi statiċi. Sistemi semistatiċi jew ta' fluss kontinwu bl-ilma ta' fuq jiġġedded kull tant jew kontinwament jistgħu jintużaw f'każijiet eċċezzjonali bħal pereżempju jekk speċifikazzjonijiet tal-kwalità tal-ilma jisfaw ma jkunux adatti għall-organiżmu tat-test jew jaffettwaw l-ekwilibriju kimiku (eż. livelli ta' ossiġnu maħlul jinżlu baxxi ħafna, il-konċentrazzjoni ta' prodotti ta' ekskreta togħla żżejjed jew minerali jlissu minn sediment u jaffettwaw il-pH u/jew il-melħ minerali fl-ilma). Iżda metodi oħra biex titjieb il-kwalità tal-ilma ta' fuq, bħal tirwiħ, għandhom normalment ikunu biżżejjed u jkunu ppreferuti.

Ikel

31. Ikun meħtieġ li l-larvi jintemgħu, preferibbilment kuljum jew mill-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa. L-ikel tal-ħut (sospensjoni fl-ilma jew ikel miżjun fin, eż. Tetra-Min jew Tetra-Phyll; ara d-dettalji fl-Appendiċi 2) fl-ammont ta' 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg għal *C. yoshimatui*) għal kull larva kuljum jidher li jkun adegwat għal larvi żgħar għall-ewwel 10 ijiem. Jista' jkun meħtieġ ftit aktar ikel għal larvi li jkollhom aktar żmien: 0,5 -1 mg għal kull larva kuljum għandu jkun suffiċjenti għall-bqija tat-test. Ir-razzjon tal-ikel għandu jitnaqqas fit-trattamenti kollha u jkun ikkontrollat jekk ikun hemm tkabbir fungali jew jekk fil-kontrolli jkunu osservati mwiet. Jekk ma jkunx jista' jitwaqqaf żvilupp fungali t-test għandu jittenna. Meta jkunu qed jiġu ttestjati sustanzi li jassorbixxu ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5), jew sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-ammont ta' ikel meħtieġ biex ikunu żgurati sopravivenza u tkabbir naturali tal-organiżmi jista' jiżdied mas-sediment formulat qabel il-perjodu ta' stabbilizzazzjoni. Għal dan, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok ikel tal-ħut, eż. tista' tintuża żieda ta' 0,5 % (piż fin-niexef) ta' weraq miżjun fin ta' eż. ħorrieqa tnigges (*Urtica dioica*), ċawsla (*Morus alba*), silla bajda (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*) jew ta' materjal ieħor tal-pjanti (*Cerophyl* jew ċelluloża alfa).

Kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni

32. Tirwiħ bil-mod tal-ilma ta' fuq f'reċipjenti tat-test ikun ipprovdut preferibbilment 24 siegħat wara li jiżdiedu l-larvi u jitkompla matul it-test kollu (għandha tingħata attenzjoni biex il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul ma tinżilx taħt 60 % ta' ASV). Tirwiħ ikun ipprovdut permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħġieġ imwaħħla 2-3 cm 'il fuq mis-saff tas-sediment (jiġifieri bużżieqa waħda jew ftit tal-ilma/sec). Meta jkunu qed jiġu ttestjati kimiċi volatili, jista' jitqies li s-sistema tas-sediment-ilma ma titrewwaħx.

33. It-test jitmexxa f'temperatura kostanti ta' 20 °C (± 2 °C). Għal *C. tentans* u *C. yoshimatui* t-temperaturi rakkomandati huma ta' 23 °C u 25 °C (± 2 °C), rispettivament. Jintuża fotoperjodu ta' 16-il siegħa u l-intensità tad-dawl għandha tkun 500 sa 1 000 lux.

Durata tal-espożizzjoni

34. L-espożizzjoni tibda biż-żieda ta' larvi fir-reċipjenti ffortifikati u ta' kontroll. Id-durata massima tal-espożizzjoni tkun ta' 28 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u 65 jum għal *C. tentans*. Jekk pappamoski jevolvu qabel, it-test jista' jitwaqqaf wara minimu ta' ħamest ijiem wara li jkun evolva l-ewwel adult fil-kontroll.

OSSERVAZZJONIJIET

Emerġenza

35. Ikunu ddeterminati ż-żmien ta' żvilupp u l-għadd totali ta' pappamoski rġiel u nisa evoluti għalkollox. L-irġiel ikunu identifikati faċilment mill-antenni tagħhom kollha pjumi.

▼M4

36. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu osservati mill-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa biex issir valutazzjoni viżiva ta' kull mġiba mhux normali (eż. tluq mis-sediment, għawm mhux tas-soltu), mqabbla mal-kontroll. Matul il-perjodu ta' evoluzzjoni mistennija jkun meħtieġ li jsir għadd kuljum ta' pappamoski li jkunu evolvew għalkollox. Is-sess u l-għadd ta' pappamoski evoluti għalkollox ikunu rreġistrati kuljum. Wara identifikazzjoni l-pappamoski jitneħħew mir-reċipjenti. Kull kwantità ta' bajd iddepożitata qabel ma jintemm it-test għandha tkun irreġistrata u mbagħad titneħħa biex larvi ma jitħallewx jerġgħu jidħlu fis-sediment. Ikun irreġistrat ukoll l-għadd ta' pupae viżibbli li jkunu naqsu li jevolvu. Gwida dwar kejl ta' evoluzzjoni hija pprovduta fl-Appendiċi 5.

Tkabbir u sopravivenza

37. Jekk għandha tkun ipprovduta dejta dwar sopravivenza u tkabbir ta' larvi għal 10 ijiem, għandhom ikunu inklużi reċipjenti addizzjonali tat-test mill-bidu, biex ikunu jistgħu jintużaw wara. Is-sediment minn dawn ir-reċipjenti addizzjonali jintgħarbel billi jintuża għarbiel ta' 250 μm biex iżomm il-larvi. Kriterji għal mewt huma immobbiltà jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimulu mekkaniku. Larvi li ma jkunux irkuprati għandhom jingħaddu wkoll bħala mejtin (larvi li jkunu mietu fil-bidu tat-test setgħu kienu ġew iddegradati minn mikrobi). Ikunu ddeterminat il-piż fin-niexef (mingħajr irmied) tal-larvi li jkunu baqgħu ħajjin għal kull reċipjent tat-test u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent. Ikun utli li jkun iddeterminat ta' liema fażi jkunu l-larvi li jkunu baqgħu ħajjin; għal dak jista' jintuża l-kejl tal-wisa' tal-iskutella tar-ras ta' kull larva.

Kejlijiet analitiċi

Konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar

38. Bħala minimu, kampjuni tal-ilma ta' fuq, tal-ilma tal-pori u tas-sediment għandhom ikunu analizzati fil-bidu (preferibbilment siegħa wara applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar) u fit-tmiem tat-test, fl-ogħla konċentrazzjoni u f'waħda aktar baxxa. Dawn id-determinazzjonijiet ta' konċentrazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar jagħtu tagħrif dwar l-imġiba/il-partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fis-sistema ilma u sediment. Teħid ta' kampjuni ta' sediment fil-bidu tat-test jista' jinfluwenza s-sistema ta' ttestjar (eż. tneħħija ta' larvi tat-test), għalhekk għandhom jintużaw reċipjenti addizzjonali tat-test biex jitwettqu determinazzjonijiet analitiċi fil-bidu u matul it-test jekk ikun jixraq (ara l-paragrafu 39). Kejlijiet fis-sediment jistgħu ma jkunx meħtieġ jekk il-partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar bejn ilma u sediment tkun ġiet iddeterminata b'mod ċar fi studju dwar ilma/sediment f'kondizzjonijiet komparabbli (eż. proporzjon ta' sediment ma' ilma, tip ta' applikazzjoni, kontenut ta' karbonju organiku ta' sediment).

39. Meta jittieħdu kejlijiet intermedji (eż. fis-7 jum) u jekk l-analiżi jkun jeħtieġilha kampjuni kbar li ma jkunux jistgħu jittieħdu minn reċipjenti tat-test mingħajr ma tkun influwenzata s-sistema ta' ttestjar, għandhom isiru determinazzjonijiet analitiċi fuq kampjuni minn reċipjenti addizzjonali tat-test ittrattati bl-istess mod (inkluża l-preżenza ta' organiżmi tat-test) iżda mhux użati għal osservazzjonijiet bijoloġiċi.

40. Ċentrifugazzjoni pereżempju ta' 10 000 g u 4°C għal 30 min. hija l-proċedura rrakkomandata biex ikun iżolat ilma interstizjali. Iżda jekk is-sustanza għall-ittestjar tkun turi li filtri ma jassorbuhiex, tista' wkoll tkun aċċettabbli l-filtrazzjoni. F'xi każijiet jista' ma jkunx possibbli li jkunu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori minħabba li d-daqs tal-kampjun ikun żgħir wisq.

▼M4

Parametri fiżikokimiċi

41. Il-pH, ossiġnu maħlul fl-ilma tat-test u t-temperatura tat-reċipjenti tat-test għandhom jitkejlu b'mod adatt (ara l-paragrafu 10). Melħ minerali fl-ilma u ammonja għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed tat-test fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fit-tmiem tat-test.

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

42. L-għan ta' dan it-test huwa biex ikun iddeterminat l-effett tas-sustanza għall-ittestjar fuq ir-rata ta' żvilupp u fuq l-għadd totali ta' pappamoski rġiel u nisa evoluti għalkollox, jew fil-każ tal-effetti tat-test ta' 10 ijiem fuq is-sopravivenza u l-piż tal-larvi. Jekk ma jkunx hemm indikazzjonijiet ta' sensitivajiet differenti statistikament ta' sessi, riżultati dwar irġiel u nisa jkunu jistgħu jinġabru għal analiżi ta' statistika. Id-differenzi ta' sensittività bejn is-sessi jistgħu jkunu ġġudikati statistikament pereżempju b'test ta' tabella χ^2-r x 2. Sopravivenza tal-larvi u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent għandha tkun ikkalkulata wara 10 jiem meta jkun meħtieġ.

43. Konċentrazzjonijiet ta' effetti espressi bħala konċentrazzjonijiet fl-ilma ta' fuq huma kkalkulati preferibbilment abbażi ta' konċentrazzjonijiet imkejla fil-bidu tat-test (ara l-paragrafu 38).

44. Biex tkun ikkomputata stima ta' punti għall-EC_{50} jew għal kull EC_x oħra, tista' tintuża statistika għal kull reċipjent bħala replika vera. Biex ikun ikkalkulat intervall ta' kunfidenza għal kull EC_x għandha titqies il-varjabbiltà fost reċipjenti, jew għandu jintwera li din il-varjabbiltà tant tkun żgħira li tista' ma titqisx. Meta l-mudell jitqiegħed minn Least Squares, għandha tkun applikata trasformazzjoni għall-istatistika għal kull reċipjent biex titjieb l-omoġeneità ta' varjanza. Iżda, valuri EC_x għandhom ikunu kkalkulati wara li r-rispons ikun ġie ttrasformat u ttieħed lura għall-valur oriġinali.

45. Meta l-analiżi ta' statistika jkollha l-għan li tiddetermina NOEC/LOEC b'ittestjar ta' ipoteżi, il-varjabbiltà fost reċipjenti jeħtiġilha titqies, eż. b'ANOVA f'aktar stadji. Alternattivament, aktar testijiet robusti (21) jistgħu jkunu adatti f'sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ksur tas-suppożizzjonijiet tas-soltu ta' ANOVA.

Proporzjon ta' evoluzzjoni

46. Proporzjonijiet ta' evoluzzjoni huma dejta alternattiva mhux kontinwa, u jistgħu jkunu analizzati bit-test ta' Cochran-Armitage applikat b'mod devoluttiv fejn tkun mistennija doża-rispons monotonika u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-istennija. Jekk le, jistgħu jintużaw test eżatt ta' Fisher jew dak ta' Mantel-Haenszel b'valuri "p" ta' Bonferroni-Holm aġġustati. Jekk ikun hemm evidenza ta' varjabbiltà akbar bejn replikati fl-istess konċentrazzjoni milli distribuzzjoni binomja tkun tindika (sikwit irriferuta bħala varjazzjoni "extrabinomja"), mbagħad għandhom jintużaw test robust ta' Cochran-Armitage jew dak eżatt ta' Fisher kif propost fi (21).

47. L-għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent, ne, ikun iddeterminat u diviż bl-għadd ta' larvi introdotti, na:

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

▼**M4**

fejn:

ER = proporzjon ta' evoluzzjoni

n_e = għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent

n_a = għadd ta' larvi introdotti għal kull reċipjent

48. Alternattiva li hija l-aktar adatta għal daqsijiet kbar ta' kampjuni, meta jkun hemm varjanza extrabinomja, hija li l-proporzjon ta' evoluzzjoni jkun ittrattat bħala rispons kontinwu u li jintużaw proċeduri bħat-test Williams meta tkun mistennija doża-rispons monotonika u tkun konsistenti ma' din id-dejta ta' ER. It-test Dunnett ikun adatt fejn il-monotoniċità ma tapplikax. Daqs kbir ta' kampjun huwa ddefinit hawn bħala l-għadd evolut, u l-għadd mhux evolut ukoll ikun aktar minn ħamsa, abbażi ta' kull replika (reċipjent).

49. Biex ikunu applikati metodi ta' ANOVA, valuri ta' ER għandhom l-ewwel ikunu ttrasformati bit-trasformazzjoni arcsin-sqrt jew bit-trasformazzjoni Freeman-Tukey biex tinkiseb distribuzzjoni normali approssimata u biex varjanzi jsiru ugwali. Jistgħu jkunu applikati t-testijiet Cochran-Armitage, dak eżatt ta' Fisher (Bonferroni), jew it-test ta' Mantel-Haenszel meta jintużaw il-frekwenzi assoluti. It-trasformazzjoni arcsin-sqrt tkun applikata billi jittieħed l-inverse sine (sin-1) tal-għerq kwadrat ta' ER.

50. Għal proporzjonijiet ta' evoluzzjoni, valuri EC_x ikunu kkalkulati billi tintuża analiżi ta' rigressjoni (jew eż. probit (22), logit, Weibull, softwer kummerċjali adatt, eċċ.). Jekk analiżi ta' rigressjoni tfalli (eż. meta jkun hemm anqas minn żewġ risponsi parzjali), jintużaw metodi mhux parametriċi oħra bħal medja mobbli jew interpolazzjoni sempliċi.

Rata ta' żvilupp

51. Il-ħin medju ta' żvilupp jirrappreżenta t-tul medju ta' żmien bejn id-dħul ta' larvi (jum 0 tat-test) u l-evoluzzjoni tal-koorti sperimentali ta' pappamoski. (Għall-kalkulazzjoni taż-żmien reali ta' żvilupp, għandha titqies l-età tal-larvi fil-waqt tad-dħul). Ir-rata ta' żvilupp hija r-reċiproka taż-żmien tal-iżvilupp (unità: 1/jum) u tirrappreżenta dik il-parti tal-iżvilupp tal-larva li sseħħ kuljum. Ir-rata ta' żvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar tossiċità ta' sediment minħabba li l-varjanza tagħha hija aktar baxxa, u hija aktar omoġenja u eqreb distribuzzjoni normali kif imqabbla ma' żmien ta' żvilupp. Għalhekk, jistgħu jintużaw proċeduri ta' test parametriku qawwija ma' rata ta' żvilupp milli ma' żmien ta' żvilupp. Għal rata ta' żvilupp bħala reazzjoni kontinwa, jistgħu jkunu stmati valuri EC_x billi tintuża analiżi ta' rigressjoni (eż. (23), (24)).

52. Għat-testijiet ta' statistika li ġejjin, l-għadd ta' pappamoski osservati f'jum ta' spezzjoni x ikunu preżunti li jkunu evolvew fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn jum x u jum x-l (l = tul tal-intervall ta' spezzjoni, is-soltu jum 1). Ir-rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent (x) tkun ikkalkulata skont:

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

fejn:

$\bar{x}$: rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent

i: indiċi ta' intervall ta' spezzjoni

m: għadd massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

▼M4

f_i: għadd ta' pappamoski evoluti fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e: għadd totali ta' pappamoski evoluti fit-tmiem tal-esperiment (= $\sum f_i$)

x_i: rata ta' żvilupp tal-pappamoski evoluti f'intervall i

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

fejn:

day_i: jum ta' spezzjoni (jiem minħabba applikazzjoni)

l_i: tul ta' intervall ta' spezzjoni i (jiem, is-soltu jum wieħed)

Rapport tat-test

53. Ir-rapport tat-test għandu mill-anqas jipprovdi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza għall-ittestjar:

— natura fiżika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (solubilità tal-ilma, pressjoni tal-fwar, koeffiċjent tal-partizzjoni fil-ħamrija (jew fis-sediment jekk ikunu disponibbli), stabbiltà fl-ilma, eċċ.);

— dejta ta' identifikazzjoni ta' kimiċi (isem komuni, isem tal-kimika, formula strutturali, Numru tal-CAS, eċċ.) inklużi l-purezza u l-metodu għall-kwantifikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar.

Speċi tat-test:

— annimali użati għat-test: speċi, isem xjentifiku, sors ta' organiżmi u kondizzjonijiet għat-trobbija;

— informazzjoni dwar maniġġar ta' kwantitajiet ta' bajd u larvi;

— l-età tal-annimali tat-test meta jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti tat-test.

Kondizzjonijiet tat-test:

— sediment użat, jiġifieri sediment naturali jew formulat;

— għal sediment naturali, post u deskrizzjoni ta' sit ta' teħid ta' kampjuni ta' sediment, inkluża, jekk ikun possibbli, storja ta' kontaminazzjoni; karatteristiċi: pH, kontenut ta' karbonju organiku, proporzjon ta' C/N u granulometrija (skont kif jixraq).

— tħejjija tas-sediment formulat: ingredjenti u karatteristiċi (kontenut ta' karbonju organiku, pH, rtubija, eċċ. fil-bidu tat-test);

— tħejjija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (konċentrazzjoni tal-ossiġnu, pH, konduttività, melħ minerali fl-ilma, eċċ. fil-bidu tat-test);

— fond tas-sediment u ilma ta' fuq;

— volum tal-ilma ta' fuq u tal-pori; piż ta' sediment imxarrab bi jew mingħajr ilma tal-pori;

— reċipjenti tat-test (materjal u daqs);

— metodu ta' tħejjija ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet u konċentrazzjonijiet ta' testijiet;

▼M4

— applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar: konċentrazzjonijiet ta' testijiet użati, għadd ta' replikati u użu ta' solvent jekk ikun hemm;

— kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni: temperatura, ċiklu ta' dawl u intensità, tirwiħ (frekwenza u intensità);

— informazzjoni dettaljata dwar għalf inkluż tip ta' ikel, tħejjija, ammont u reġim ta' għalf.

Riżultati:

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejla tat-testijiet u r-riżultati tal-analizi kollha biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fir-reċipjent tat-test;

— il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, jiġifieri pH, temperatura, ossiġnu maħlul, melħ minerali fl-ilma u ammonja;

— bdil ta' ilma evaporat tat-test, jekk ikun hemm;

— għadd ta' pappamoski evoluti rġiel u nisa għal kull reċipjent u għal kull jum;

— għadd ta' larvi li jkunu naqsu li jevolvu bħala pappamoski għal kull reċipjent;

— medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent, u għal kull faži, skont il-każ;

— perċentwali ta' evoluzzjoni għal kull replika u konċentrazzjoni tat-test (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);

— rata medja ta' żvilupp ta' pappamoski żviluppati għalkollox għal kull replika u rata ta' trattament (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);

— stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi eż. CEx (u intervalli assoċjati ta' kunfidenza), NOEC u/jew LOEC u l-metodi ta' statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluża kull influwenza fuq il-konklużjonijiet tar-riżultati tat-testijiet minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

LETTERATURA:

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

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Kanada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Kanada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Kanada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità għal Ħniex,

(15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a żero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a żero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Għall-fini ta'dan il-metodu jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sediment ifformulat jew sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku, huwa taħlita ta' materjali li jintużaw biex jimitaw l-komponenti fiżiċi ta' sediment naturali.

Ilma ta' fuq huwa l-ilma li jitqiegħed fuq sediment fir-reċipjent tat-test.

Ilma interstizjali jew ilma tal-pori huwa l-ilma li jokkupa l-ispazju bejn sediment u partiċelli tal-ħamrija.

Ilma fortifikat huwa l-ilma tat-test li miegħu tkun ġiet miżjuda s-sustanza għall-ittestjar.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 2

Rakkomandazzjonijiet għal kultura ta' *Chironomus riparius*

1. Larvi ta' *Chironomus* jistgħu jitkabbru f'dixxijiet ta' kristallizzazzjoni jew f'kontenituri akbar. Ramel fin tal-quartz jitferrex f'saff irqiq ta' madwar 5 as 10 mm fond fuq il-qiegħ tal-kontenitur. Kieselguhr (eż. Merck, Art 8117) ukoll intwera li huwa substrat adatt (saff irqaq ta' sa ftit ħafna mm ikun biżżejjed). Wara jiżdied ilma adattat għal fond ta' diversi cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jimtlew kull meta huwa meħtieġ biex jieħdu post it-telf li jirriżulta mill-evaporazzjoni, u jkun ta' repevenzjoni kontra d-dessekazzjoni. L-ilma jista' jinbidel jekk ikun meħtieġ. Għandu jkun ipprovdut tirwiħ bil-mod. Ir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi għandhom jinżammu f'gaġġa apposta li ma tħallix li l-adulti li jkunu qed jevolvu jaħarbu. Il-gaġġa għandha tkun kbira biżżejjed biex adulti evoluti ma jitħallewx jimirħu fi qtajja kbar, għax inkella tista' ma ssirx kopulazzjoni (il-minimu huwa ta' madwar 30 x 30 x 30 cm).

2. Gaġeġ għandhom jinżammu f'temperatura ambjentali jew f'kamra ambjentalment kostanti ta' 20 + 2 °C b'perjodu fotografiku ta' 16-il siegħa dawl (intensità madwar 1 000 lux), 8 sigħat dlam. Kien irrapportat li umdità tal-arja ta' anqas minn 60 % RH tista' tfixkel ir-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuża kull ilma tajjeb naturali jew sintetiku. Komunement jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit li jkun tneħħielu l-kloru u midja artifiċjali (eż. il-midjum Elendt "M4" jew "M7", ara hawn taħt). L-ilma għandu jitrewwaħ qabel ma jintuża. Jekk ikun meħtieġ, l-ilma tal-kultura jista' jiġġedded billi l-ilma użat jitferra' jew jgħaddi minn ġo sifun minn reċipjenti ta' kultura b'attenzjoni mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larvi.

Tmigħ tal-larvi

4. Larvi ta' *Chironomus* għandhom jintemgħu ikel ta' trofof tal-ħut (Tetra Min®, Tetra Phyll® jew marka simili oħra ta' ikel tal-ħut proprjetarju), f'bejn wieħed u ieħor 250 mg għal kull reċipjent kuljum. Dan jista' jingħata bħala trab mitħun niexef jew bħala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ta' ikel ta' trofof jiżdied ma' 20 ml ta' ilma ta' dilwizzjoni u jitħallat biex jagħti taħlita omoġenja. Din it-tħejjija tista' tintema' f'rata ta' madwar 5 ml għal kull reċipjent kuljum (ixxejkja qabel ma tuża). Larvi li jkollhom aktar żmien jistgħu jirċievu aktar.

5. It-tmigħ jista' jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum ta' kultura "jissaħħab", it-tmigħ għandu jitnaqqas. Żidiet ta' ikel għandhom ikunu mmonitorjati b'attenzjoni. Ikel mill-anqas jikkawża tluq tal-larvi lejn il-kolonna tal-ilma, u ħafna ikel jikkawża aktar attività mikrobika u konċentrazzjonijiet tal-ossiġnu mnaqqsin. Iż-żewġ kondizzjonijiet jistgħu jġibu magħhom rati ta' tkabbir imnaqqas.

6. Xi ċelluli ta' alka ħadra (eż. Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris) jistgħu wkoll jiżdiedu meta jitqiegħdu f'reċipjenti ġodda ta' kultura.

Tmigħ ta' adulti evoluti

7. Xi wħud minn dawk li jagħmlu esperimenti ssuġġerew li kuxxinett tat-tajjar mgħaddas f'soluzzjoni saturata tas-sukrożju jista' jservi ta' ikel għal adulti evoluti.

▼M4

Emerġenza

8. F'20 + 2 °C adulti jibdew jevolvu mir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi wara bejn wieħed u ieħor 13 - 15-il jum. L-irġiel jintgħarfu malajr għax ikollhom antenni kollha pjumi.

Kwantitajiet ta' bajd

9. Malli l-adulti jkunu fil-gaġġa tat-trobbija, ir-reċipjenti kollha għat-tkabbir tal-larvi għandhom ikunu eżaminati tliet darbiet fil-ġimgħa għal tqegħid ta' kwantitajiet ta' bajd qisu ġelatina. Jekk ikun hemm, il-kwantitajiet ta' bajd għandhom jitneħħew b'attenzjoni. Il-bajd għandu jkun ittrasferit għal ġo dixx żgħir li jkun fih kampjun tal-ilma tat-trobbija. Kwantitajiet ta' bajd jintużaw biex jinbeda reċipjent ġdid ta' kultura (eż. 2 - 4 kwantitajiet ta' bajd/reċipjent) jew biex jintużaw għal testijiet tat-tossiċità.

10. Larvi tal-ewwel fażi għandhom ifaqqsu wara 2 - 3 ijiem.

Reċipjenti ġodda ta' kultura

11. Malli jkunu stabbiliti kulturi għandu jkun possibbli li jitqiegħed reċipjent ġdid ta' kultura tal-larvi kull ġimgħa jew anqas ta' spiss skont ħtiġijiet ta' ttestjar, billi jitneħħew ir-reċipjenti aktar qodma wara li jkunu evolvew pappamoski adulti. Bl-użu ta' din is-sistema jkun hemm provvista regolari ta' adulti b'anqas maniġġar.

Tħejjija ta' soluzzjonijiet tat-testijiet "M4" u "M7"

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midjum "M4". Il-midjum "M7" jitħejja bħala l-midjum "M4" ħlief għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom konċentrazzjonijiet ikunu erba' darbiet aktar baxxi f'"M7" milli f'"M4". Qed titħejja pubblikazzjoni dwar il-midjum "M7" (Elendt, komunikazzjoni personali). Is-soluzzjoni tat-test ma għandhiex tkun ippreparata skont Elendt u Bias (1990) għall-konċentrazzjonijiet ta' NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 u K2HPO4 mogħtija għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet stokk mhumiex adegwati.

Tħejjija tal-midjum "M7"

13. Each soluzzjoni ta' stokkijiet (I) titħejja waħda waħda u soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II) titħejja minn dawn is-soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) (ara Tabella 1). 50 ml mis-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II) u l-ammonti ta' kull soluzzjoni ta' stokkijiet ta' makronutrijenti li jidhru fit-Tabella 2 huma magħmulin minn sa 1 l ta' ilma dejonizzat biex jitħejja l-midjum "M7". Titħejja soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini billi jiżdiedu tliet vitamini mal-ilma dejonizzat kif indikat fit-Tabella 3, u jiżdied 0,1 ml tas-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien ta' vitamini mal-midjum "M7" finali ftit qabel ma jintuża. (Is-soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini tinħażen iffriżata f'alikwoti żgħar). Il-midjum jitrewwaħ u jkun stabbilizzat.

Tabella 1

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' mikroelementi għall-midjum M4 u M7

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I)	Ammont (mg) magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): ħallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u agħmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I)	Ammont (mg) magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): ħallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u agħmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dawn is-sustanzi huma differenti f'M4 u f'M7, kif indikat hawn taħt.
(2) Dawn is-soluzzjonijiet jitħejjew waħda waħda, mbagħad jitferrgħu flimkien u jiġu pproċessati minnufih f'awtoklav (reċipjent li jingħalaq awtomatikament).

Tabella 2

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' makronutrijenti għall-midjum M4 u M7

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' makronutrijenti miżjudin biex jitħejja midjum M4 and M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabella 3

Soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini għall-midjum M4 u M7

It-tliet soluzzjonijiet kollha ta' vitamini jingħaqdu flimkien biex jagħmlu soluzzjoni waħda ta' stokkijiet ta' vitamini.

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini miżjudin biex jitħejja midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tijamina	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

LETTERATURA:

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

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendiċi 3

THEJJIJA TA' SEDIMENT FORMULAT

Kompożizzjoni tas-sediment

Il-kompożizzjoni tas-sediment formulat għandha tkun kif ġej:

Kostitwent	Karatteristiċi	% ta' sediment piż fin-niexef
Pit	Pit ta' ħażiż Sphagnum, qrib kemm jista' jkun ta' pH 5,5-6,0 mingħajr ma tibqa' tidher il-pjanta, mitħun fin (partiċelli ta' daqs ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja	4-5
Ramel tal-quartz	Daqs ta' ramla: > 50 % tal-partiċelli għandhom ikunu fil-firxa ta' 50-200 μm	75-76
Tafal tal-kawlina	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %	20
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda ta' pit u ramel	2 (±0,5)
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$,pulverizzat, kemikament pur	0,05 - 0,1
Ilma	Konduttività ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Thejjija

Il-pit jitnixxef bl-arja u jintaħan fi trab fin. Titħejja sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat billi jintuża apparat ta' omoġeneizzazzjoni ta' prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni jiġi aġġustat sa 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni tiġi kkondizzjonata għal mill-anqas jumejn billi titħawwad bil-mod f'20 ± 2 °C, biex il-pH isir stabbli u jistabbilixxi komponent mikrobiku stabbli. Il-pH jerġa' jitkejjel u għandu jkun 6,0 ± 0,5. Mbagħad is-sospensjoni tal-pit titħallat mal-kostitwenti l-oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ma' ilma dejonizzat biex jinkiseb sediment omoġenju b'kontenut ta' ilma f'firxa ta' 30-50 % tal-piż fin-niexef tas-sediment. Il-pH tat-taħlita finali jerġa' jitkejjel għal darb'oħra u jiġi aġġustat għal 6,5 sa 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun meħtieġ. Jittieħdu kampjuni tas-sediment biex ikun iddeterminat il-piż fin-niexef u l-kontenut ta' karbonju organiku. Mbagħad, qabel ma jintuża fit-test tat-tossiċità tal-kironomidi, huwa rrakkomandat li s-sediment formulat ikun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taħt l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti.

Ħżin

Il-kostitwenti nixfin għat-thejjija tas-sediment artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post niexef u frisk f'temperatura ambjentali. Is-sediment formulat (mxarrab) m'għandux jinħażen qabel ma jsir użu minnu fit-test. Għandu jintuża minnufih wara l-perjodu ta' kondizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-thejjija tiegħu.

LETTERATURA:

Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness. Tossiċità għal Ħniex.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Appendiċi 4

Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettbbli

Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja partikulata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 µg/l
Ebusija bħala $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Kloru residwali	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforuż totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloriċi totali flimkien ma' polikloro-bifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

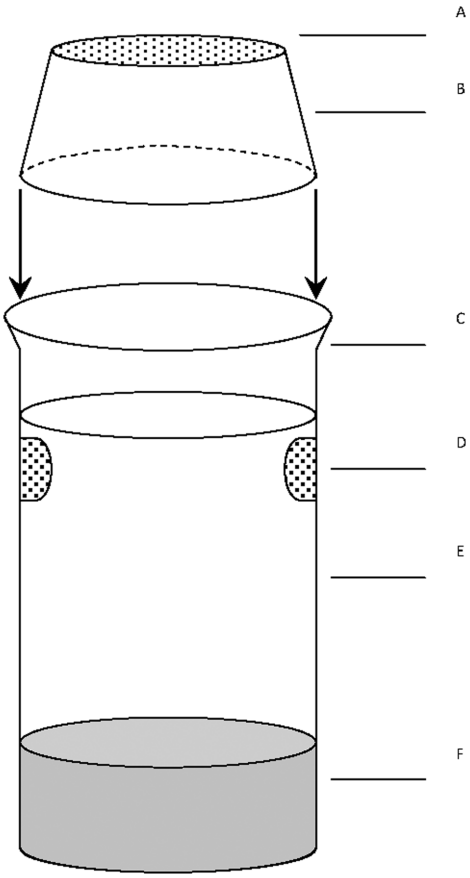
(*) Iżda għandu jkun innotat li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni).

▼**M4**

Appendiċi 5

Gwida għall-monitoraġġ tal-evoluzzjoni ta' larvi kironomidi

Sifuni ta' evoluzzjoni jitqiegħdu fuq il-bekkijiet tat-test. Dawn is-sifuni jkunu meħtieġa mill-20 jum sa meta jintemm it-test. Eżempju ta' sifun li jintuża huwa pinġut hawn taħt:



A: l-iskrijn tan-nylon

B: il-kikkri tal-plastik maqluba

C: il-bekk ta' espożizzjoni mingħajr xoffa

D: il-portijiet tal-iskrijn li jibdlu l-ilma

E: ilma

F: sediment

▼M4

C.29. BIJODEGRADABBILTÀ FAĊLI - CO_2 F'REĊIPJENTI SSIĠILLATI (TEST TA' SPAZJU FUQ)

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 310 (2006) tal-OECD. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa metodu ta' tgħarbil għall-evalwazzjoni tal-bijodegradabbiltà faċli ta' kimiċi u jipprovdi informazzjoni simili għas-sitt metodi ta' ttestjar deskritti fil-kapitolu C.4 ta' dan l-Anness A sa F. Għalhekk kimika li turi riżultati pożittivi f'dan il-Metodu ta' Ttestjar tista' titqies bijodegradabbli faċilment fl-ambjent.

2. Il-metodu stabbilit sewwa tad-dijossidu tal-karbonju (CO_2) (1), ibbażat fuq it-test oriġinali ta' Sturm (2) għall-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà ta' kimiċi organiċi, bil-kejl tad-diossidu tal-karbonju prodott minn azzjoni mikrobika, normalment kien l-ewwel għażla għall-ittestjar ta' kimiċi li ftit jinħallu u ta' dawk li jassorbu ħafna. Il-metodu jintgħażel ukoll għal kimiċi li jinħallu (iżda li mhumiex volatili), minħabba li l-evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju titqies minn ħafna li hija l-unika prova inekwivoka ta' attività mikrobika. It-tneħħija ta' karbonju organiku maħlul tista' ssir bi proċessi fiżikokimiċi - sorbiment, volatilizzazzjoni, preċipitazzjoni, idroliżi - kif ukoll b'azzjoni mikrobika, u ħafna reazzjonijiet mhux bijoloġiċi jikkunsmaw ossiġnu; CO_2 rarament ikun prodott minn kimiċi organiċi b'mod abijotiku. Fit-test oriġinali u modifikat ta' Sturm (1)(2) CO_2 jitneħħa mill-fażi likwida għal ġor-reċipjenti ta' assorbiment b'tixrix (jiġifieri arja kollha bżieżaq ittrattata biex tneħħi CO_2 permezz tal-midjum likwidu), filwaqt li fil-verżjoni ta' Larson (3)(4) CO_2 jiġi ttrasferit mir-reċipjent ta' reazzjoni għal ġor-reċipjenti ta' assorbiment billi l-arja mingħajr CO_2 tgħaddi mill-Ispazju Fuq u, addizzjonalment, ir-reċipjent tat-test jiġi xxejkjat kontinwament. Fil-modifika ta' Larson biss ir-reċipjent ta' reazzjoni jiġi xxejkjat; it-taħwid huwa speċifikat biss għal sustanzi li ma jinħallux f'ISO 9439 (5) u fil-verżjoni oriġinali tal-US (6), li t-tnejn li huma jispeċifikaw it-tixrix milli l-bdil tal-Ispazju Fuq. F'metodu uffiċjali ieħor ta' EPA tal-US (7) ibbażat fuq il-metodu ta' Gledhill (8), ir-reċipjent ta' reazzjoni xxejkjat jingħalaq għall-atmosfera u CO_2 prodott jinġabar f'sifun tal-aklalina direttament mill-fażi gassuża, bħal fi fliexken klassiċi ta' respiromiter ta' Warburg/Barcroft.

3. Iżda karbonju inorganiku (IC) intwera li jakkumula fil-midjum matul l-applikazzjoni tat-test Sturm standard, modifikat għal għadd ta' kimiċi (9). Kienet instabet konċentrazzjoni ta' IC għolja daqs 8 mg/l matul id-degradazzjoni ta' 20 mg C/l ta' anilina. Għalhekk il-ġbir ta' CO_2 fis-sifuni tal-aklalina ma kienx jirrifletti verament l-ammont ta' CO_2 prodott mikrobijoloġikament f'ħinijiet intermedji matul id-degradazzjoni. Minħabba dan, l-ispeċifikazzjoni li > 60 % tal-produzzjoni ta' CO_2 massimu teoretiku ($ThCO_2$) għandha tinġabar f'"perjodu ta' 10-d" (l-10 ijiem li jiġu minnufih wara li tinkiseb 10 % ta' bijodegradazzjoni) biex kimika għall-ittestjar tkun ikklassifikat bħala li tiddegrada malajr bijoloġikament, ma titħarisx għal xi kimiċi li jkunu hekk ikklassifikati bl-użu tat-tneħħija ta' karbonju organiku maħlul (DOC).

4. Meta l-perċentwali ta' degradazzjoni tkun valur aktar baxx milli mistenni, IC ikun possibbilment akkumulat fis-soluzzjoni tat-test. Mbagħad id-degradabbiltà tista' tkun ivvalutata mat-testijiet l-oħra lesti tal-bijodegradabbiltà.

▼M4

5. Żvantaġġi oħra tal-metodoloġija Sturm (goffa, tieħu ż-żmien, aktar suxxettibbli għal żbalji sperimentali u mhix applikabbli għal kimiċi volatili) aktar qabel kienu ġiegħlu li ssir tfittxija għal teknika ta' reċipjent issiġillat, barra dak ta' Gledhill, aktarx milli fluss ta' gass kontinwu (10)(11). Boatman et al (12) eżaminaw mill-ġdid il-metodi ta' qabel u adottaw sistema ta' Spazju Fuq magħluq li biha CO_2 tħalla joħroġ fl-Ispazju Fuq fit-tmiem ta' inkubazzjoni b'aċidifikazzjoni tal-midjum. CO_2 tkejjel b'analiżi tal-kromatografija tal-gass (GC)/IC f'kampjuni meħudin awtomatikament tal-Ispazju Fuq iżda ma tqisx il-karbonju inorganiku maħlul (DIC) fil-fażi likwida. Ir-reċipjenti użati wkoll kienu żgħar ħafna (20 ml) u kienu jesgħu biss 10 ml ta' midjum, li ħolqu problemi eż. meta jiżdiedu l-ammonti bilfors żgħar ħafna ta' kimiċi għall-ittestjar li ma jinħallux, u/jew meta jista' ma jkunx hemm mikroorganiżmi biżżejjed jew ebda minnhom fil-midjum imlaqqam li jkunu jistgħu jiddegradaw kimiċi għall-ittestjar.

6. Dawn id-diffikultajiet intgħielbu mill-istudji indipendenti ta' Struijs u Stoltenkamp (13) u ta' Birch u Fleccher (14), dawn tal-aħħar kienu ispirati mill-esperjenza tagħhom ma' apparat użat fit-test anaerobiku ta' bijodegradazzjoni (15). Fl-ewwel metodu (13) CO_2 jitkejjel fl-Ispazju Fuq wara aċidifikazzjoni u ekwilibrazzjoni, filwaqt li f'tal-aħħar (14) DIC kemm fil-fażi gassuża kif ukoll f'dik likwida tkejjel mingħajr trattament; aktar minn 90 % ta' IC ifformat kien jinsab fil-fażi likwida. Iż-żewġ metodi kellhom vantaġġi fuq it-test Sturm għaliex is-sistema ta' ttestjar kienet aktar kompatta u mmaniġġabbli, kimiċi volatili jistgħu jiġu ttestjati u tkun evitata l-possibbiltà ta' dewmien biex jitkejjel CO_2 prodott.

7. Iż-żewġ approċċi ngħaqdu f'CO_2 Standard tal-ISO fl-Ispazju Fuq (16), li għadda mir-ringtest (17) u huwa dan l-Istandard li jifforma l-bażi ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar. Bl-istess mod, iż-żewġ approċċi kienu użati fl-EPA tal-US (18). Kienu rrakkomandati żewġ metodi ta' kejl ta' CO_2, jiġifieri CO_2 fl-Ispazju Fuq wara aċidifikazzjoni (13) u ta' IC fil-fażi likwida wara ż-żieda ta' alkali żejda. Dan l-aħħar metodu kien introdott minn Peterson matul ir-ring test CONCAWE (19) ta' dan il-Metodu ta' Spazju Fuq modifikat biex ikejjel il-bijodegradabbiltà inerenti. Il-bidliet magħmulin fir-reviżjoni tal-1992 (20) tal-metodi fil-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness għal Bijodegradabbiltà Faċli kienu inkorporati f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, biex il-kondizzjonijiet (midjum, durata, eċċ.) ikunu xort'oħra l-istess bħal dawk fit-test Sturm rivedut (20). Birch u Fletcher (14) urew li kienu nkisbu riżultati jixxiebħu ħafna b'dan it-test ta' Spazju Fuq bħalma kienu nkisbu bl-istess kimiċi fir-Ring Test tal-OECD (21) tal-Metodi ta' Ttestjar riveduti.

PRINĊIPJU TAT-TEST

8. Il-kimika għall-ittestjar, normalment f'20 mg C/l, bħala s-sors waħdani ta' karbonju u enerġija, tkun inkubata f'midjum ta' lqugħ ta' melħ minerali li jkun tlaqqam bi kwantità mħallta ta' mikroorganiżmi. It-test isir fi fliexken issiġillati bi Spazju Fuq ta' arja li jipprovdi riżerva ta' ossiġnu għal bijodegradazzjoni aerobika. L-evoluzzjoni ta' CO_2 li tiġi mill-bijodegradazzjoni aerobika finali tal-kimika għall-ittestjar tkun iddeterminata bil-kejl ta' IC prodott fil-fliexken tat-test iżjed minn dak prodott f'reċipjenti in bjank li jkun fihom biss midjum imlaqqam. Kemm ikun hemm bijodegradazzjoni jkun espress bħala perċentwali tal-produzzjoni ta' IC massimu teoretiku (ThIC), ibbażat fuq il-kwantità ta' kimika għall-ittestjar (bħala karbonju organiku) miżjud fil-bidu.

9. Tista' wkoll titkejjel it-tneħħija ta' DOC u/jew kemm ikun hemm bijodegradazzjoni primarja tal-kimika għall-ittestjar (20).

▼M4

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR

10. Il-kontenut ta' karbonju organiku (% w/w) tal-kimika għall-ittestjar jeħtieġlu jkun magħruf, mill-istruttura kimika tiegħu jew mill-kejl, biex tkun ikkalkulata d-degradazzjoni. Għal kimiċi volatili ta' ttestjar, il-kostant imkejjel jew ikkalkulat tal-liġi ta' Henry jkun utli biex ikun iddeterminat proporzjon adatt ta' Spazju Fuq ma' volum ta' likwidu. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganiżmi tkun utli fl-għażla ta' konċentrazzjoni adatta tat-test u għall-interpretazzjoni ta' riżultati li juru bijodegradabbiltà fqira: huwa rrakkomandat li jkun inkluż il-kontroll tal-inibizzjoni sakemm ma jkunx magħruf li l-kimika għall-ittestjar ma tkunx inibitorja għal attivitajiet mikrobiċi (ara l-paragrafu 24).

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU

11. It-test ikun applikabbli għal kimiċi għall-ittestjar li ma jinħallux, għalkemm għandu jkun żgurat tixrid sewwa tal-kimika għall-ittestjar. Bl-użu tal-proporzjon rakkomandat ta' Spazju Fuq ma' volum ta' likwidu ta' 1:2, jistgħu jkunu ttestjati kimiċi volatili bil-kostant tal-liġi ta' Henry ta' sa 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ minħabba li l-proporzjon ta' kimika għall-ittestjar fl-Ispazju Fuq ma jkunx aktar minn 1 % (13). Jista' jintuża volum iżgħar ta' Spazju Fuq meta jkunu ttestjati kimiċi, li jkunu aktar volatili, iżda d-disponibbiltà bijoloġika tista' tillimita l-aktar jekk dawn ikunu ftit jinħallu fl-ilma. Iżda dawk li jużawh għandhom jiżguraw li l-proporzjon tal-Ispazju Fuq ma' volum ta' likwidu u l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ikunu hekk li jkun hemm ossiġnu biżżejjed biex titħalla ssir bijodegradazzjoni aerobika sħiħa (eż. evita li tuża konċentrazzjoni għolja ta' substrat u volum żgħir ta' Spazju Fuq). Gwida dwar dan tinsab fi (13)(23).

KIMIĊI TA' REFERENZA

12. Biex tkun eżaminata l-proċedura tat-test, għandha tkun ittestjata kimika ta' referenza ta' bijodegradabbiltà magħrufa b'mod parallel. Għal dan il-għan jistgħu jintużaw anilina, benżoat tas-sodju jew glikol tal-etilen meta jkunu ttestjati kimiċi għall-ittestjar li jinħallu fl-ilma u ottanol-1 għal kimiċi għall-ittestjar li ftit jinħallu (13). Il-bijodegradazzjoni ta' dawn il-kimiċi għandha tilħaq > 60 % ThIC fi żmien 14-il jum.

RIPRODUĊIBBILTÀ

13. Fir-ring test tal-ISO tal-metodu (17), ir-riżultati li ġejjin inkisbu bl-użu tal-kondizzjonijiet irrakkomandati, inkluż test C ta' kimika/1 ta' 20 mg.

Kimika għall-ittestjar	Perċentwali medju ta' bijodegradazzjoni (28d)	Koeffiċjent ta' varjazzjoni (%)	Għadd ta' Laboratorji
Anilina	90	16	17
Ottanol-1	85	12	14

Il-varjabbiltà (replikabbiltà) fit-test, bl-użu tal-anilina, kienet baxxa b'koeffiċjenti ta' varjabbiltà mhux akbar minn 5 % f'kull test li sar. Fiż-żewġ każijiet li fihom ir-replikabbiltà kienet agħar, il-varjabbiltà akbar aktarx kienet dovuta minħabba produzzjoni għolja ta' IC fl-in bjanki. Ir-replikabbiltà kienet agħar b'ottanol-1 iżda kienet għadha anqas minn 10 % għal 79 % ta' testijiet li saru. Din il-varjabbiltà akbar fit-test setgħet kienet dovuta minħabba żbalji fid-dożar, minħabba li kellu jkun injettat volum żgħir (3 sa 4 µl) ta' ottanol-1 fi fliexken tat-test issiġillati. Koeffiċjenti ogħla tal-varjazzjoni jirriżultaw meta jintużaw konċentrazzjonijiet iktar baxxi tal-kimika għall-ittestjar, speċjalment f'konċentrazzjonijiet li huma inqas minn 10 mg C/l. Dan jista' jingħeleb parzjalment billi titnaqqas il-konċentrazzjoni tal-karbonju inorganiku totali (TIC) fit-tilqima.

▼**M4**

14. F'ring-test tal-UE (24) ta' ħames tensjoattivi miżjudin f'10 mg C/l, nkisbu r-riżultati li ġejjin:

Kimika għall-ittestjar	Perċentwali medju ta' bijodegradazzjoni (28d)	Koeffiċjent ta' varjazzjoni (%)	Għadd ta' laboratorji
Tetrapropilin Sulfonat tal-benżen	17	45	10
Suċċinat ta' di-iso-ottil sulfoniku (anjoniku)	72	22	9
Klorur tal-ammonja eżadeċil-trimetil (*) (katjoniku)	75	13	10
Iso-Nonilfenol -(etossilat)$_9$ (mhux joniku)	41	32	10
Sulfobetaina tal-Kako-amid-propil tal-idrossi tad-dimetil (amfoterika)	60	23	11

(*) Kien miżjud SiO_2 biex jinnewtralizza t-tossiċità.

Ir-riżultati juru li ġeneralment il-varjabbiltà kienet ogħla għall-aġenti tensjoattivi anqas iddegradati sewwa. Varjabbiltà fit-test kienet anqas minn 15 % għal aktar minn 90 % tal-każijiet, bl-ogħla tilħaq 30-40 %.

NOTA: Kważi l-aġenti tensjoattivi kollha mhumiex speċi molekulari waħda iżda huma taħlitiet ta' isomeri, omologi, eċċ. li jiddegradaw wara perjodi differenti ta' intervalli karatteristiċi u b'rati kinetiċi differenti li jirriżultaw f'kurvi "mċajprin", estenwati, biex is-60 % tal-valur ta' pass ma jintlaħaqx "fil-perjodu ta' 10-d", anki jekk kull speċi molekulari għaliha waħidha tilħaq > 60 % fi żmien 10 jiem jekk tkun ittestjata waħidha. Dan jista' jkun osservat ukoll f'taħlitiet oħra kumplessi.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

15. Apparat normali tal-laboratorju u:

(a) Fliexken tas-serum tal-ħġieġ, issiġillati b'tappijiet tal-lastku tal-butil u siġilli tal-aluminju li jeħel. Id-daqs rakkomandat huwa 125 ml li jkollu volum totali ta' madwar 160 ml (f'dan il-każ il-volum ta' kull flixkum għandu jkun magħruf li huwa 160 ± 1 ml). Reċipjent ta' daqs iżgħar jista' jintuża meta r-riżultati jħarsu l-kondizzjonijiet deskritti fil-paragrafu 66 u 67;

(b) Analizzatur tal-karbonju jew strument ieħor (eż. kromatografu tal-gass) għall-kejl ta' karbonju inorganiku;

▼M4

(c) Siringi ta’ preċiżjoni kbira għal kampjuni gassużi u likwidi;

(d) Xejker orbitali f’ambjent ikkontrollat bit-temperatura;

(e) Provvista ta’ arja mingħajr CO_2 – din tista’ titħejja billi l-għarja tgħaddi minn granijiet tal-ġir tas-soda jew billi tintuża taħlita ta’ gass ta’ 80 % N_2/20 % 0_2 (fakultattiv) (ara l-paragrafu 28);

(f) Apparat ta’ filtrazzjoni b’membrani ta’ porożità ta’ 0,20 – 0,45 μm porożità (fakultattiv);

(g) Analizzatur ta’ karbonju organiku (fakultattiv).

Reaġenti

16. Uża reaġenti ta’ grad analitiku għal kollox.

Ilma

17. Għandu jintuża ilma distillat jew dejonizzat li jkun fih ≤1 mg/l bħala karbonju organiku totali. Dan jirrappreżenta ≤ 5 % tal-kontenut ta’ karbonju organiku tal-bidu introdott bid-doża rakkomandata tal-kimika għall-ittestjar.

Soluzzjonijiet ta’ stokkijiet għall-midjum ta’ melħ minerali

18. Is-soluzzjonijiet ta’ stokkijiet u l-midjum ta’ melħ minerali huma simili għal dawk ta’ ISO 14593 (16) u C.4 testijiet ta’ “bijodegradabbiltà faċli” (20). L-użu ta’ konċentrazzjoni għolja ta’ klorur tal-ammonju (2,0 g/l minflok 0,5 g/l) għandu jkun neċessarju biss f’każijiet verament eċċezzjonali, eż. meta l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar hija > 40 mg C/l. Soluzzjonijiet ta’ stokkijiet għandhom ikunu maħżuna fi friġġ u jintremew wara sitt xhur, jew qabel jekk ikun hemm evidenza ta’ preċipitazzjoni jew tkabbir mikrobiku. Ħejji dawn is-soluzzjonijiet ta’ stokkijiet li ġejjin:

(a) Fosfat anidru tal-idroġenu tal-potassju (KH_2PO_4) 8,50 g

Fosfat tal-idroġenu tad-dipotassju (K_2HPO_4), 21,75 g

Fosfat diidrat tal-idroġenu tad-disodju ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Klorur tal-ammonju (NH_4Cl) 0,50 g

Ħoll fl-ilma u ġib 1 litru. Il-pH ta’ din is-soluzzjoni għandu jkun 7,4 (± 0,2). Jekk dan ma jkunx il-każ, allura ħejji soluzzjoni ġdida.

(b) Klorur tal-kalċju diidrat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; 36,40 g

Ħoll fl-ilma u ġib 1 litru.

(c) Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Ħoll fl-ilma u ġib 1 litru.

(d) Eksaidrat tal-klorur tal-ħadid (III) ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Ħoll fl-ilma u ġib 1 litru u żid qatra waħda ta’ HCl konċentrat.

Tħejjija ta’ midjum minerali

19. Ħallat 10 ml ta’ soluzzjoni (a) ma’ bejn wieħed u ieħor 800 ml ilma (paragrafu 17), mbagħad żid 1 ml ta’ soluzzjonijiet (b), (c) u (d) u ġib 1 litru bl-ilma (paragrafu 17).

Reaġenti oħra

20. Aċidu ortofosforiku konċentrat (H3PO4) (> 85 % massa għal kull volum).

▼M4

Soluzzjoni 7M ta' idrossidu tas-sodju

21. Ħoll 280 g ta' idrossidu tas-sodju (NaOH) f'1 litru ta' ilma (paragrafu 17). Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' DIC ta' din is-soluzzjoni u qis dan il-valur meta tikkalkula r-riżultat tat-test (ara l-paragrafi 55 u 61), l-aktar fid-dawl tal-kriterju tal-validità fil-paragrafu 66 (b). Ħejji soluzzjoni ġdida jekk il-konċentrazzjoni ta' DIC tkun għolja żżejjed.

Kimika għall-ittestjar:

22. Ħejji soluzzjoni ta' stokkijiet ta' kimika għall-ittestjar li tinħall biżżejjed fl-ilma (paragrafu 17) jew fil-midjum tal-ittestjar (paragrafu 19) f'konċentrazzjoni preferibbilment ta' 100 darba akbar mill-konċentrazzjoni finali li jkollha tintuża fit-test; jista' jkun meħtieġ li jkun aġġustat pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Is-soluzzjoni ta' stokkijiet għandha tiżdied mal-midjum minerali biex tagħti konċentrazzjoni ta' karbonju organiku finali ta' bejn 2 u 40 mg C/l, preferibbilment 20 mg C/l. Jekk jintużaw konċentrazzjonijiet iktar baxxi minn dawn, il-preċiżjoni miskuba tista' ma tkunx tajba. Kimiċi likwidi li jinħallu u li ma jinħallux jistgħu jiżdiedu fir-reċipjenti billi jintużaw direttament siringi ta' preċiżjoni kbira. Kimiċi għall-ittestjar li ftit jinħallu u li ma jinħallux jista' jkun jeħtiġilhom trattament speċjali (25). L-għażliet huma:

(a) żieda diretta ta' ammonti miżuna magħrufa;

(b) tixrid ultrasoniku qabel żieda;

(c) tixrid bl-għajnuna ta' aġenti emulsjonanti li jkunu meħtieġa biex ikun stabbilit jekk ikollhomx xi effetti inibitorji jew stimulatorji fuq attività mikrobika qabel iż-żieda;

(d) sorbiment ta' kimiċi likwidi tat-test, jew soluzzjoni f'solvent volatili adatt, għal fuq midjum jew sostenn inerti (eż. filtru tal-fibra tal-ħġieġ), segwiti minn evaporazzjoni tas-solvent, jekk jintuża, u żieda diretta ta' ammonti magħrufin;

(e) żieda ta' volum magħruf ta' soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'solvent faċilment volatili f'reċipjent tat-test vojt, segwita mill-evaporazzjoni tas-solvent.

Aġenti jew solventi użati f'(c), (d) u (e) għandhom ikunu ttestjati għal kull effett stimulatorju jew inibitorju fuq attività mikrobika (ara l-paragrafu 42(b)).

Kimiċi ta' referenza

23. Ħejji soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika ta' referenza (li tinħall) fl-ilma (paragrafu 17) f'konċentrazzjoni preferibbilment 100 darba akbar mill-konċentrazzjoni final li jkollha tintuża (20 mg C/l) fit-test.

Verifika ta' inibizzjoni

24. Kimiċi għall-ittestjar sikwit ma juru ebda degradazzjoni sinifikanti taħt il-kondizzjonijiet użati f'valutazzjonijiet ta' bijodegradazzjoni faċli. Kawża waħda possibbli hija li l-kimika għall-ittestjar tkun inibitorja għat-tilqima fil-konċentrazzjoni li fiha tkun applikata fit-test. Verifika ta' inibizzjoni tista' tkun inkluża fit-tifsila tat-test biex titħaffef l-identifikazzjoni (retrospettivament) ta' inibizzjoni bħala kawża possibbli jew fattur kontributorju. Alternattivament, il-verifika ta' inibizzjoni tista' teskludi interferenzi bħal dawn u turi li ebda jew ftit degradazzjoni tkun attribwibbli biss għall-fatt li ma tkunx soġġetta għal attakk mikrobiku taħt il-kondizzjonijiet tat-test. Biex tinkiseb informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganiżmi (aerobiċi), ħejji soluzzjoni fil-midjum tal-ittestjar li jkun fiha l-kimika għall-ittestjar u l-kimika ta' referenza (paragrafu 19), kull waħda fl-istess konċentrazzjonijiet kif miżjuda, rispettivament (ara l-pargrafi 22 u 23).

▼M4

Tilqima

25. It-tilqima tista' tkun ġejja minn varjetà ta' sorsi: ħama attivat; effluwent tad-dranaġġ (mhux bil-kloru); ilmijiet tal-wiċċ u ħamrija; jew minn taħlita ta' dawn (20). L-attività bijodegradattiva tas-sors għandha tkun ivverifikata billi tintuża kimika ta' referenza. Ikun xi jkun is-sors, mikroorganiżmi li qabel kienu esposti għall-kimika għall-ittestjar m'għandhomx jintużaw jekk il-proċedura jkollha tintuża bħala test għal bijodegradabbiltà faċli.

Twissija: Ħama attivat, dranaġġ u effluwent tad-dranaġġ li jkun fih organiżmi patoġeniċi u għandhom ikunu ttrattati b'kawtela.

26. Ibbażat fuq esperjenza, l-aħjar volum għat-tilqima huwa dak li:

— ikun suffiċjenti biex jirrendi attività bijodegradattiva adegwata;

— jiddegrada l-kimika ta' referenza bil-perċentwali stipulat (ara l-paragrafu 66);

— jagħti 10^2 sa 10^5 unitajiet ta' formazzjoni ta' kolonji għal kull millilitru fit-taħlita finali;

— normalment jagħti konċentrazzjoni ta' 4 mg/l ta' solidi sospiżi fit-taħlita finali meta jintuża ħama attivat; jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet sa 30 mg/l iżda jistgħu jżidu b'mod sinifikanti l-produzzjoni ta' CO_2 tal-in bjanki (26);

— jikkontribwixxi anqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni inizjali ta' karbonju organiku introdott mil-kimika għall-ittestjar;

— ikun ġeneralment 1-10 ml ta' tilqima għal 1 litru tas-soluzzjoni tat-test.

Ħama attivat

27. Ħama attivat jinġabar frisk mit-tank ta' tirwiħ ta' impjant ta' trattament tad-dranaġġ jew minn unità ta' skala ta' laboratorju li tittratta l-aktar dranaġġ domestiku. Jekk ikun meħtieġ, partiċelli raffi għandhom jitneħħew billi jintgħarblu (eż. billi jintuża għarbiel b'xibka ta' 1 mm^2) u l-ħama għandu jinżamm aerobiku sakemm jintuża.

28. Alternattivament, wara tneħħija ta' kull partikola raffa, ħalli l-ħama joqgħod jew iċċentrifugah (eż. 1 100 x g għal 10 minuti). Warrab il-likwidu supernatant. Il-ħama jista' jinħasel fis-soluzzjoni minerali. Issospendi l-ħama konċentrat f'midjum minerali biex jirrendi konċentrazzjoni ta' 3-5 g solidi sospiżi/l.

29. Ħama għandu jittieħed minn impjant ta' trattament konvenzjonali li jaħdem sewwa. Jekk ħama jkollu jittieħed minn impjant ta' trattament ta' rata għolja, jew jitqies li jkun fih inibituri, huwa għandu jinħasel. Ħallih joqgħod jew iċċentrifuga l-ħama sospiż mill-ġdid wara li jkun tħallat sewwa, warrab il-likwidu supernatant u erġa' ssospendi l-ħama maħsul f'volum ulterjuri ta' midjum minerali. Tenni din il-proċedura sakemm il-ħama jitqies li jkun ħieles minn substrat jew inibitur żejjed.

30. Wara li tkun inkisbet sospensjoni kompleta, jew b'ħama mhux ittrattat, irtira kampjun eżatt qabel l-użu, għad-determinazzjoni tal-piż fin-niexef tas-solidi sospiżi.

31. Alternattiva ulterjuri hija li ħama attivat jiġi omoġeinizzat (3-5 g ta' solidi sospiżi/l). Ittratta l-ħama fi blender Waring għal 2 minuti b'veloċità medja. Ħalli l-ħama mħallat joqgħod għal 30 minuta jew aktar jekk ikun meħtieġ u ferra' l-likwidu għal użu bħala tilqima bir-rata ta' madwar 10 mg/l ta' midjum minerali.

▼M4

32. Tnaqqis ukoll ulterjuri tal-evoluzzjoni CO_2 in bjank jista' jinkiseb billi l-ħama jitrewwaħ matul il-lejl b'arja mingħajr CO_2. Uża 4 mg/l ta' solidi ta' ħama attivat bħala l-konċentrazzjoni tat-tilqima f'dan it-test (13).

Effluwent ta' dranaġġ sekondarju

33. Alternattivament, it-tilqima tista' toriġina mill-effluwent sekondarju ta' impjant ta' trattament jew unità ta' skala ta' laboratorju li tirċievi l-aktar dranaġġ domestiku. Żomm il-kampjun f'kondizzjonijiet aerobiċi u uża fil-jum tal-ġbir, jew ikkondizzjonah minn qabel jekk ikun meħtieġ. L-effluwent għandu jkun iffiltrat permezz ta' filtru raff biex titneħħa materja partikolata ħoxna u jitkejjel il-valur tal-pH.

34. Biex inaqqas il-kontenut ta' IC tiegħu, il-filtrat jitraxxax b'arja mingħajr CO_2 (paragrafu 15-e) għal siegħa filwaqt li l-pH jinżamm f'6,5 billi jintuża aċidu ortofosforiku (paragrafu 20). Il-valur tal-pH jitreġġa għall-valur oriġinali tiegħu bl-idrossidu tas-sodju (paragrafu 21) u, wara li jkun qagħad għal madwar siegħa, volum adatt tas-supernatant jittieħed biex jitlaqqam. Din il-proċedura ta' tixrix tnaqqas il-kontenut ta' IC tat-tilqima. Pereżempju, meta l-volum massimu rrakkomandat ta' effluwent imraxxax iffiltrat (100 ml) għal kull litru kien użat bħala tilqima, l-ammont ta' IC li kien hemm fir-reċipjenti ta' kontroll in bjank kien fil-firxa ta' 0,4 sa 1,3 mg/l (14), li tirrappreżenta 2-6,5 % tal-kimika għall-ittestjar C f'20 mg C/l u 4-13 % f'10 mg C/l.

Ilmijiet tal-wiċċ

35. Jittieħed kampjun ta' ilma tal-wiċċ adatt. Għandu jinżamm f'kondizzjonijiet aerobiċi u jintuża fil-jum tal-ġbir. Il-kampjun għandu jkun ikkonċentrat, jekk ikun meħtieġ, b'filtrazzjoni jew ċentrifugazzjoni. Il-volum ta' tilqima li jkollha tintuża f'kull reċipjent tat-test għandha tħares il-kriterji mogħtijin fil-paragrafu 26.

Ħamrija

36. Jittieħed kampjun ta' ħamrija adatta, miġbura f'fond ta' sa 20 cm taħt il-ħamrija tal-wiċċ. Ġebel, fdalijiet ta' pjanti u invertebrati għandhom jitneħħew mill-kampjun ta' ħamrija qabel ma jintgħarbel b'xibka ta' 2 mm (jekk il-kampjun ikun imxarrab wisq biex jintgħarbel minnufih, f'dak il-każ għandu jitnixxef parzjalment bl-arja biex jitħaffef it-tgħarbil). Għandu jinżamm f'kondizzjonijiet aerobiċi u jintuża fil-jum tal-ġbir (Jekk il-kampjun jinġarr f'borża sewda tal-polietilen maqfula ħafif, ikun jista' jinħżen f'2 sa 4 oC fil-borża sa xahar).

Kondizzjonament minn qabel ta' tilqima

37. Tilqima tista' tkun ikkondizzjonata minn qabel għall-kondizzjonijiet sperimentali, iżda ma tkunx adattata minn qabel għall-kimika għall-ittestjar. Kondizzjonament minn qabel jista' jnaqqas l-evoluzzjoni ta' CO_2 in bjank. Kondizzjonament minn qabel jikkonsisti f'tirwiħ ta' ħama attivat wara dilwizzjoni f'midjum tal-ittestjar għal 30 mg/l b'arja niedja mingħajr CO_2 għal sa 5-7 ijiem fit-temperatura tat-test.

PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' fliexken

38. L-għadd ta' fliexken (paragrafu 15-a) meħtieġa għal test ikun jiddependi mill-frekwenza ta' analiżi u minn kemm idum it-test.

39. Huwa rrakkomandat li fliexken tripliċi jkunu analizzati wara għadd suffiċjenti ta' intervalli ta' żmien b'mod li l-perjodu ta' 10-d ikun jista' jiġi identifikat. Ukoll mill-anqas ħames fliexken tat-test (paragrafu 15-a) mis-settijiet (a), (b) u (c) (ara l-paragrafu 42) ikunu analizzati fit-tmiem tat-test, biex ikunu jistgħu jiġu kkalkulati 95 % ta' intervalli ta' kunfidenza għall-valur medju ta' perċentwali ta' bijodegradazzjoni.

▼M4

Midjum imlaqqam

40. It-tilqima tintuża f'konċentrazzjoni ta' 4 mg/l ta' solidi nixfin ta' ħama attivat. Ħejji minnufih qabel l-użu midja mlaqqma b'mod suffiċjenti billi żżid, pereżempju, 2 ml ħama attivat ittrattat sewwa (paragrafi 27 to 32) f'2 000 mg/l għal 1 litru ta' midjum ta' melħ minerali (paragrafu 19). Meta jkollu jintuża effluwent ta' dranaġġ sekondarju żid sa 100 ml effluwent (paragrafu 33) għal midjum ta' 900 ml ta' melħ minerali (paragrafu 19) u ddilwixxi 1 litru bil-midjum.

Tħejjija ta' fliexken

41. Alikwoti ta' midjum imlaqqam jitqiegħdu fi fliexken replikati biex jagħtu proporzjon ta' Spazju Fuq ma' likwidu ta' 1:2 (eż. żid 107 ml fi fliexken li jesgħu 160 ml). Jistgħu jintużaw proporzjonijiet oħra, iżda ara t-twissija mogħtija fil-paragrafu 11. Meta tuża tilqima ta' wieħed miż-żewġ tipi, għandha tingħata attenzjoni biex ikun żgurat li l-midjum imlaqqam jitħallat b'mod adegwat biex ikun żgurat li jitqassam b'mod uniformi fil-fliexken tat-test.

42. Settijiet ta' fliexken (paragrafu 15a) jitħejjew biex jesgħu dan li ġej:

(a) Reċipjent tat-test (indikat F_T) li jkun fih il-kimika għall-ittestjar;

(b) Kontrolli in bjank (indikati F_B) li jkun fihom biss il-midjum tal-ittestjar flimkien ma' tilqima; għandhom jiżdiedu wkoll kull kimika, solventi, aġenti jew filtri tal-fibra tal-ħġieġ użati biex tiddaħħal il-kimika għall-ittestjar fir-reċipjenti tat-test;

(c) Reċipjenti (indikati F_C) biex tkun ivverifikata l-proċedura li jkun fiha l-kimika ta' referenza;

(d) Jekk ikun meħtieġ, reċipjenti (indikati F_I) biex ikun iċċekkjat jekk possibbilment ikunx hemm effett inibitorju tal-kimika għall-ittestjar li jkun fiha kemm il-kimika għall-ittestjar kif ukoll il-kimika ta' referenza fl-istess konċentrazzjonijiet (paragrafu 24) bħal fil-fliexken F_T u F_C, rispettivament;

(e) Reċipjenti (indikati F_S) biex ikun iċċekkjat jekk possibbilment ikunx hemm degradazzjoni abijotika bħal (a) 50 mg/l oħra ta' $HgCl_2$ jew sterilizzati b'xi mezzi oħra (eż. b'għeluq awtomatiku).

43. Kimiċi għall-ittestjar li jinħallu fl-ilma u kimiċi ta' referenza jiżdiedu bħala soluzzjonijiet ta' stokkijiet milwiema (paragrafi 22, 23 u 24) biex jagħtu konċentrazzjoni ta' 10 sa 20 mg C/l.

44. Kimiċi li ma jinħallux u kimiċi ta' referenza li jinħallu jiżdiedu fi fliexken b'varjetà ta' modi (ara l-paragrafu 22a-e) skont in-natura tal-kimika għall-ittestjar, qabel jew wara żieda tal-midjum imlaqqam, skont il-metodu ta' trattament tal-kimika għall-ittestjar. Jekk tkun użata waħda mill-proċeduri mogħtijin fil-paragrafu 22a-e, f'dak il-każ il-fliexken in bjank F_B (paragrafu 42b) għandhom ikunu ttrattati b'mod simili iżda tkun eskluża l-kimika għall-ittestjar jew il-kimika ta' referenza.

45. Kimiċi volatili ta' ttestjar għandhom ikunu injettati għal ġo fliexken issiġillati (paragrafu 47) billi tintuża siringa żgħira. Id-doża tkun ikkalkulata mill-volum injettat u mid-densità tal-kimika għall-ittestjar.

46. Ilma għandu jiżdied f'reċipjenti, fejn ikun meħtieġ, biex jagħti l-istess volum likwidu f'kull reċipjent. Għandu jkun żgurat li l-proporzjon ta' Spazju Fuq ma' likwidu (is-soltu 1:2) u l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ikunu tali li jkun hemm ossiġnu biżżejjed fl-Ispazju Fuq biex titħalla ssir bijodegradazzjoni kompleta.

▼M4

47. Il-fliexken kollha mbagħad jiġu ssiġillati, pereżempju b'septa tal-lastku tal-butil u b'għotjien tal-aluminju. kimiċi volatili tat-testijiet għandhom jiżdiedu f'dan l-istadju (paragrafu 45). Jekk it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni ta' DOC tas-soluzzjoni tat-test ikollu jkun immonitorjat u jkollha ssir analiżi mingħajr ħin għal konċentrazzjoni tal-bidu ta' IC (kontrolli sterili, paragrafu 42e) jew għal determinanti oħra, erfa' kampjun adatt mir-reċipjent tat-test. Ir-reċipjent tat-test u l-kontenut tiegħu mbagħad jitwarrbu.

48. Il-fliexken issiġillati jitqiegħdu fuq xejker rotatorju (paragrafu 15d), b'rata ta' xxejkjar suffiċjenti biex iżżomm il-kontenut tal-fliexken imħallat sewwa u f'sospensjoni (eż. 150 għal 200 rpm), u inkubat fid-dlam f'20 °C, li għandu jinżamm f'± 1 °C.

Teħid ta' kampjuni

49. Ix-xejra ta' teħid ta' kampjuni tkun tiddependi mill-perjodu ta' intervalli u mir-rata kinetika ta' bijodegradazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Il-fliexken jintużaw għall-analiżi u jinqerdu fil-jum tat-teħid tal-kampjuni, li għandu jsir mill-anqas darba fil-ġimgħa jew aktar sikwit (eż. darbtejn fil-ġimgħa) jekk tkun meħtieġa kurva kompleta ta' degradazzjoni. L-għadd meħtieġ għall-fliexken tar-replikati jittieħed mix-xejker, u jirrappreżenta F_T, F_B u F_C u, jekk jintużaw F_I u F_S (ara l-paragrafu 42). It-test normalment idum 28 jum. Jekk il-kurva ta' bijodegradazzjoni tindika li tkun intlaħaq livell kostanti qabel 28 jum, it-test jista' jingħalaq qabel 28 jum. Ħu kampjuni minn ħames fliexken riżervati għat-28 jum tat-test għal analiżi u uża r-riżultati biex tikkalkula l-limiti ta' kunfidenza jew il-koeffiċjent ta' varjazzjoni ta' perċentwali ta' bijodegradazzjoni. Fliexken li jirrappreżentaw il-verifiki għal inibizzjoni u għal degradazzjoni abijotika jistgħu ma jitteħdulhomx kampjuni sikwit daqs il-fliexken l-oħra; 1 jum u 28 jiem ikunu suffiċjenti.

Analiżi ta' karbonju inorganiku (IC)

50. Il-produzzjoni ta' CO_2 fil-fliexken tkun iddeterminata billi titkejjel iż-żieda fil-konċentrazzjoni ta' karbonju inorganiku (IC) matul inkubazzjoni. Hemm żewġ metodi rakkomandati disponibbli għall-kejl tal-ammont ta' IC prodott fit-test, u dawn huma deskritti minnufih hawn taħt. Minħabba li l-metodi jistgħu jagħtu riżultati ftit differenti, wieħed biss għandu jintuża meta jsir test.

51. Metodu (a) huwa rrakkomandat jekk il-midjum aktarx li jkun fih fdalijiet ta', pereżempju, karta ta' filtru tal-ħġieġ u/jew kimika għall-ittestjar li ma tinħallx. Din l-analiżi tista' ssir billi jintuża kromatografu tal-gass jekk ma jkunx hemm analizzatur tal-karbonju. Huwa importanti li l-fliexken ikunu fi jew qrib it-temperatura tat-test meta l-gass tal-Ispazju Fuq ikun analizzat. Metodu (b) jista' jkun eħfef għal laboratorji li jużaw analizzaturi tal-karbonju biex ikejlu IC. Huwa importanti li s-soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju (paragrafu 21) użata biex CO_2 jinbidel f'karbonat tkun jew tħejjiet m'ilux jew li l-kontenut ta' IC ikun magħruf, biex din tkun tista' titqies meta jkunu kkalkulati r-riżultati tat-testijiet (ara l-paragrafu 66-b.)

Metodu (a): aċidifikazzjoni għal pH < 3

52. Qabel kull lott ta' analiżi, l-analizzatur ta' IC jiġi kkalibrat billi jintuża standard ta' IC adattat (eż. 1 % w/w CO_2 f'N_2). Aċidu ortofosforiku konċentrat (paragrafu 20) jiġi injettat tul is-septum ta' kull flixkun li jkun itteħidlu kampjun biex ibaxxi l-pH tal-midjum għal < 3 (eż. żid 1 ml għal midjum tal-ittestjar ta' 107 ml). Il-fliexken jitreġġgħu fuq ix-xejker. Wara li jkunu xxejkjati għal siegħa f'temperatura tat-test il-fliexken jitneħħew mix-xejker, alikwoti (eż. 1 ml) tal-gass ikunu rtirati mill-Ispazju Fuq ta' kull flixkun u injettati fl-analizzatur ta' IC. Il-konċentrazzjonijiet imkejla ta' IC ikunu rreġistrati bħala mg C/l.

▼M4

53. Il-prinċipju ta' dan il-metodu huwa li wara aċidifikazzjoni għal pH < 3 u ekwilibrazzjoni f'20 C, il-kostant tal-ekwilibriju għad-distribuzzjoni ta' CO_2 bejn il-fażijiet likwidi u gassużi fil-fliexken tat-test ikun 1,0 meta mkejjel bħala konċentrazzjoni (13). Dan għandu jintwera għas-sistema tat-test mill-anqas darba kif ġej:

Lesti fliexken li jkun fihom 5 u 10 mg/l bħala IC billi tuża soluzzjoni ta' karbonat tas-sodju anidru (Na_2 CO_3) f'ilma mingħajr CO_2 mħejji bl-aċidifikazzjoni tal-ilma għal pH 6,5 b'aċidu ortofosforiku konċentrat (paragrafu 20), b'tixrix matul l-lejl b'arja mingħajr CO_2 u billi tgħolli l-pH għal newtralità b'alkali. Żgura li l-proporzjon tal-volum tal-Ispazju Fuq mal-volum ta' likwidu jkun l-istess bħal fit-testijiet (eż. 1:2). Agħmel aċidu u ekwilibra kif deskritt fil-paragrafu 52, u kejjel il-konċentrazzjonijiet ta' IC kemm tal-Ispazju Fuq kif ukoll tal-fażijiet likwidi. Ivverifika li ż-żewġ konċentrazzjonijiet ikunu l-istess fil-limitu ta' żbalji sperimentali. Jekk ma jkunux, l-operatur għandu jeżamina mill-ġdid il-proċeduri. Din il-verifika tad-distribuzzjoni ta' IC bejn fażijiet likwidi u gassużi tista' ma ssirx kull darba li jsir it-test; preżumibbilment tista' ssir waqt li tkun qed issir il-kalibrazzjoni.

54. Jekk it-tneħħija ta' DOC ikollha titkejjel (kimiċi għall-ittestjar biss li jinħallu fl-ilma), għandhom jittieħdu kampjuni tal-fażi likwida minn fliexken separati (mhux magħmulin aċiduż), iffiltrati b'membrana u injettati għal ġol-analizzatur ta' DOC. Dawn il-fliexken jistgħu jintużaw għal analiżi oħra daqs kemm ikun meħtieġ, biex titkejjel bijodegradazzjoni primarja.

Metodu (b): konverżjoni ta' CO_2 għall-karbonat

55. Qabel kull lott ta' analizi, l-analizzatur ta' IC ikun ikkalibrat billi jintuża standard adattat - pereżempju, soluzzjoni ta' sodju bikarbonat ($NaHCO_3$) f'ilma mingħajr CO_2 (ara l-paragrafu 53) fil-firxa 0 sa 20 mg/l bħala IC. Soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (7M, paragrafu 21) (eż. 1 ml għal midjum ta' 107 ml) tiġi injettata tul is-septum ta' kull flixkun li jkun itteħidlu kampjun u l-fliexken jiġu xxejkjati għal sigħa fit-temperatura tat-test. Uża l-istess soluzzjoni ta' NaOH għall-fliexken kollha li jintużaw u jinqerdu f'jum partikolari, iżda mhux neċessarjament f'kull okkażjoni li jittieħed kampjun tul it-test kollu. Jekk ikunu meħtieġa valuri IC assoluti in bjank fl-okkażjonijiet kollha ta' teħid ta' kampjuni, ikunu meħtieġa determinazzjonijiet ta' IC tas-soluzzjoni ta' NaOH kull darba li tintuża. Il-fliexken jitneħħew mix-xejker u jitħallew joqogħdu. Volumi adatti (eż. 50 għal 1 000 µl) tal-fażi likwida f'kull reċipjent jittieħdu b'siringa. Il-kampjuni jiġu injettati għal ġol-analizzatur IC u l-konċentrazzjonijiet ta' IC jiġu rreġistrati. Għandu jkun żgurat li l-analizzatur użat ikun mgħammar sewwa biex ikun jista' jittratta kampjuni alkalini prodotti b'dan il-metodu.

56. Il-prinċipju ta' dan il-metodu huwa li wara ż-żieda ta' alkali u xxejkjar, il-konċentrazzjoni ta' IC fl-Ispazju Fuq tkun negliġibbli. Dan għandu jkun ivverifikat għas-sistema ta' ttestjar mill-anqas darba billi jintużaw standards IC, biż-żieda ta' alkali u ekwilibrazzjoni, u bil-kejl tal-konċentrazzjoni ta' IC kemm fl-Ispazju Fuq kif ukoll fil-fażijiet likwidi (ara l-paragrafu 53). Il-konċentrazzjoni fl-ispazju fuq għandha tersaq għal żero. Din il-verifika tal-assorbiment kważi sħiħ ta' CO_2 ma jkunx meħtieġ li ssir kull darba li jsir it-test.

57. Jekk it-tneħħija ta' DOC ikollha titkejjel (kimiċi għall-ittestjar biss li jinħallu fl-ilma), għandhom jittieħdu kampjuni tal-fażi likwida minn fliexken separati (li ma jkunx fihom alkali miżjuda), iffiltrati b'membrana u injettati għal ġol-analizzatur ta' DOC. Dawn il-fliexken jistgħu jintużaw għal analiżi oħra daqs kemm ikun meħtieġ, biex titkejjel bijodegradazzjoni primarja.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

Kalkolu tar-riżultati

58. Jekk wieħed jassumi mineralizzazzjoni ta' 100 % tal-kimika għall-ittestjar għal CO_2, ThIC iżjed minn dak prodott fil-kontrolli in bjank ikun daqs TOC miżjud għal kull flixkun tat-test fil-bidu tat-test, jiġifieri:

$$ThIC = TOC.$$

Il-massa totali (mg) ta' karbonju inorganiku (TIC) f'kull flixkun tkun:

$$TIC = (\text{mg C fil} - \text{likwidu} + \text{mg C fl} - \text{ispazju fuq}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Ekwazzjoni [1]}$$

fejn:

VL = volum ta' likwidu fil-flixkun (litru);

CL = konċentrazzjoni ta' IC fil-likwidu (mg/l bħala karbonju);

VH = volum tal-ispazju fuq (litru);

CH = konċentrazzjoni ta' IC fl-ispazju fuq (mg/l bħala karbonju).

Il-kalkulazzjonijiet ta' TIC għaż-żewġ metodi analitiċi użati għall-kejl ta' IC f'dan it-test huma deskritt fil-paragrafi 60 u 61. Perċentwali ta' bijodegradazzjoni (% D) f'kull każ tidher bħala:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Ekwazzjoni [2]}$$

fejn:

TICt = mg ta' TIC fi flixkun tat-test f'ħin t;

TICb = mg medja ta' TIC fi fliexken in bjank f'ħin t;

TOC = mg ta' TOC miżjuda fil-bidu fir-reċipjent tat-test.

Il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni ta' % ta' D ikun ikkalkulat għat-test (F_T), referenza (F_C) u, jekk ikun inkluż kontroll ta' monitoraġġ ta' inibizzjoni (F_I), għall-fliexken mill-ammonti rispettivi ta' TIC prodotti saż-żmien ta' kull teħid ta' kampjuni.

59. Jekk kien hemm żieda sinifikanti fil-kontenut ta' TIC tal-kontrolli sterili (F_S) tul il-perjodu ta' test, f'dak il-każ wieħed jista' jikkonkludi li tkun seħħet degradazzjoni abijotika tal-kimika għall-ittestjar u din għandha titqies fil-kalkulazzjoni ta' D fl-Ekwazzjoni [2].

Aċidifikazzjoni għal pH < 3

60. Minħabba li l-aċidifikazzjoni għal pH < 3 u l-ekwilibrazzjoni biex il-konċentrazzjoni ta' TIC fil-likwidu u fil-fażijiet gassużi tkun indaqs, il-konċentrazzjoni biss ta' IC fil-fażi ta' gass tkun jeħtiġilha titkejjel. Għal-hekk, mill-ekwazzjoni [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, fejn V_B volum ta' flixkun tas-serum.

Bdil ta' CO_2 għal karbonat

61. F'dan il-metodu jsiru kalkulazzjonijiet bħal fl-Ekwazzjoni [1], iżda ma jitqisx l-ammont negliġibbli ta' IC fil-fażi gassuża, jiġifieri $V_H \times C_H = 0$, u $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Espressjoni ta' riżultati

62. Kurva ta' bijodegredazzjoni tinkiseb bl-ipplottjar tal-persentaġġ ta' bijodegredazzjoni, D, kontra l-ħin tal-inkubazzjoni u jekk possibbli, il-faži ta' intervalli, il-faži ta' bijodegredazzjoni, il-perjodu ta' 10-d u l-faži ta' livell kostanti, il-faži li fiha d-degredazzjoni massima tkun intlaħqet u l-kurva tal-bijoddegredazzjoni llivellat, kif hemm indikat. Jekk jinkisbu riżultati komparabbli għar-reċipjenti tat-test parallelli F_T (< 20 % differenza), tiġi pplottjata kurva medja (ara l-Appendiċi 2, Fig. 1); jekk le, il-kurvi jiġu pplottjati għal kull reċipjent. Ikun iddeterminat il-valur medju tal-perċentwali ta' bijodegradazzjoni fil-faži ta' livell kostanti jew ikun ivvalutat l-ogħla valur (eż. meta l-kurva tonqos fil-faži ta' livell kostanti), iżda huwa importanti li jkun ivvalutat li f'dan l-aħħar każ il-valur ma jkunx erratiku. Indika dan il-livell massimu ta' bijodegradazzjoni bħala "grad ta' bijodegradazzjoni tal-kimika għall-ittestjar" fir-rapport tat-test. Jekk l-għadd ta' reċipjenti tat-test ma kienx biżżejjed biex jindika faži ta' livell kostanti, id-dejta mkejla tal-aħħar jum tat-test tintuża biex ikun ikkalkulat valur medju. Dan l-aħħar valur, il-medja ta' ħames replikati, iservi biex jindika l-preċiżjoni li biha l-perċentwali ta' bijodegradazzjoni kien iddeterminat. Irrapporta wkoll il-valur miksub fit-tmiem tal-perjodu ta' 10-d.

63. Fl-istess mod, tiġi pplottjata kurva għall-kimika ta' referenza F_C u, jekk inkluża għall-kontroll ta' eliminazzjoni abijotika F_S u l-kontroll ta' inibizzjoni F_I.

64. L-ammonti ta' TIC preżenti fil-kontrolli in bjank (F_B) jiġu repistrati kif inhuma rreġistrati dawk fil-fliexken F_S (kontroll abijotiku), jekk dawn ir-reċipjenti kienu inklużi fit-test.

65. Ikkalkula D għar-reċipjenti F_I abbażi tar-rendiment IC teoretiku antiċipat mill-komponent ta' referenza tat-taħlita biss. Jekk, fit-28 jum, jirriżulta $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, wieħed ikun jista' jassumi li l-kimika għall-ittestjar tkun waqqfet l-attività tat-tilqima, u dan jista' jkun il-kawża ta' valuri baxxi ta' D_{FT} miksubin taħt il-kondizzjonijiet tat-test. F'dan il-każ it-test jista' jittenna billi tintuża konċentrazzjoni tat-test aktar baxxa u preferibbilment jitnaqqsu DIC fit-tilqima u TIC ffurmat fil-kontrolli in bjank, minħabba li konċentrazzjoni aktar baxxa xort'oħra tnaqqas mill-preċiżjoni tal-metodu. Alternattivament, tista' tintuża tilqima oħra. Jekk fi flixkun F_S (abijotiku) tkun osservata żieda sinifikanti (> 10 %) fl-ammont ta' TIC, jistgħu jkunu seħħew proċessi ta' degradazzjoni abijotika.

Validità ta' riżultati

▼M7

66. Test jitqies validu jekk:

a) il-perċentwali medju ta' degradazzjoni fir-reċipjenti F_C li jkun fihom is-sustanza kimika ta' referenza jkun > 60 % sal-14-il jum ta' inkubazzjoni; u

b) l-ammont medju ta' TIC li jkun hemm fil-kontrolli inbjank F_B fi tmiem it-test ikun < 3mg C/l.

Jekk dawn il-limiti ma jkunux issodisfati, it-test għandu jiġi ripetut b'inokulu minn sors ieħor u/jew għandhom jerġgħu jiġu eżaminati l-proċeduri użati. Pereżempju, jekk il-produzzjoni għolja ta' inbjank IC tkun problema, għandha tkun segwita l-proċedura mogħtija fil-paragrafi 27 sa 32.

(1) Il-perċentwali ta' degradazzjoni f'Reċipjenti F_C li jkun fihom is-sustanza ta' referenza
(2) Il-perċentwali ta' degradazzjoni f'Reċipjenti F_I

▼M4

67. Jekk il-kimika għall-ittestjar ma tilħaqx 60 % ThIC u ma jkunx intwera li kienet inibitorja (paragrafu 65), it-test jista' jittenna b'konċentrazzjoni ogħla ta' tilqim (sa 30 mg/l ta' ħama attivat u 100 ml ta' effluwent/l) jew b'tilqimiet minn sorsi oħra, l-aktar jekk id-degradazzjoni kienet fil-firxa ta' 20 sa 60 %.

Interpretazzjoni tar-riżultati

68. Bijodegradazzjoni > 60 % ThIC fil-perjodu ta' 10-d f'dan it-test turi li l-kimika għall-ittestjar tkun bijodegradabbli faċilment f'kondizzjonijiet aerobiċi.

69. Jekk il-valur ta' pass ta' 60 % ThIC ma jintlaħaqx, iddetermina l-valur pH f'midja fi fliexken li jkunux saru aċidużi jew alkalini; valur ta' anqas minn 6.5 jista' jindika li tkun seħħet nitrifikazzjoni. F'każ bħal dan tenni t-test b'soluzzjoni bafer ta' konċentrazzjoni ogħla.

Rapport tat-Test

70. Ikkompila tabella ta' % ta' D għal kull test (F_T), referenza (F_C) u, jekk ikun inkluż, flixkun ta' inibizzjoni ta' kontroll (F_I) għal kull jum li fih ikunu ttieħdu kampjun. Jekk jinkisbu riżultati komparabbli għal fliexken replikati, immarka kurva ta' medja ta' % ta' D mal-ħin. Irreġistra l-ammont ta' TIC fl-in bjanki (F_B) u fil-kontrolli sterili (F_S) DOC u/jew f'determinanti oħra, u fil-perċentwali ta' tneħħija tagħhom.

71. Iddetermina l-valur medju ta' % ta' D fil-fażi ta' livell kostanti, jew uża l-ogħla valur jekk il-kurva ta' bijodegradazzjoni tonqos fil-fażi ta' livell kostanti, u rrapporta dan bħala "grad ta' bijodegradazzjoni tal-kimika għall-ittestjar". Huwa importanti jkun żgurat li f'dan l-aħħar każ l-ogħla valur ma jkunx erratiku.

72. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

— isem komuni, isem tal-kimika, numru tal-CAS, formula strutturali u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti;

— purezza (impuritajiet) ta' kimika għall-ittestjar.

Kondizzjonijiet tat-test:

— referenza għal dan il-Metodu ta' Ttestjar;

— deskrizzjoni tas-sistema ta' ttestjar użata (eż. volum tar-reċipjent, proporzjon ta' Spazju Fuq ma' likwidu, metodu ta' taħwid, eċċ);

— applikazzjoni ta' kimika għall-ittestjar u kimika ta' referenza għal sistema ta' ttestjar: konċentrazzjoni tat-test użata u ammont ta' karbonju ddożat f'kull flixkun tat-test, kull użu ta' solventi;

— dettalji tat-tilqima użat, kull trattament minn qabel u kondizzjonament minn qabel;

— temperatura ta' inkubazzjoni;

— validazzjoni tal-prinċipju ta' analiżi ta' IC;

— karatteristiċi ewlenin tal-analizzatur ta' IC użat (u kull metodu analitiku ieħor użat);

— għadd ta' replikati.

Riżultati:

— dejta mhux maħduma u valuri kkalkulati ta' bijodegradabbiltà f'forma tabulari;

▼M4

— il-grafika ta’ perċentwali ta’ degradazzjoni mal-ħin għat-test u kimiċi ta’ referenza, il-fażi ta’ intervalli, fażi ta’ degradazzjoni, perjodu ta’ 10-d u anglu;

— perċentwali ta’ tneħħija f’livell kostanti, fi tmiem ta’ test, u wara perjodu ta’ 10-d;

— raġunijiet għal kull twarrib tar-riżultati tat-testijiet;

— kull fatt ieħor li jkun rilevanti għall-proċedura segwita;

— diskussjoni dwar ir-riżultati.

LETTERATURA:

(1) Il-Kapitolu C.4 ta’ dan l-Anness: Determinazzjoni ta’ Bijodegradabbiltà “Faċli” – Test ta’ Evoluzzjoni ta’ CO_2 (Metodu C.4-C).

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness: Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà "Faċli".

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness: Test ta' inibizzjoni ta' respirazzjoni ta' ħama attivat.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) UE (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Appendiċi 1

ABBREVJAZZJONIJIET U DEFINIZZJONIJIET

IC: Karbonju inorganiku

ThCO$_2$: Id-dijossidu tal-karbonju teoretiku (mg) huwa l-kwantità ta' dijossidu tal-karbonju kkakluat li għandu jiġi prodott mill-kontentu tal-karbonju magħruf jew imkejjel tal-kimika għall-ittestjar meta jiġi mineralizzat kompletament; espress ukoll bħala mg ta' dijossidu tal-karbonju għal kull mg ta' kimika għall-ittestjar.

DOC: Karbonju organiku maħlul huwa l-karbonju organiku li jkun hemm f'soluzzjoni jew dak li jgħaddi minn filtru ta' 0,45 mikromiter jew jibqa' fis-supernatant wara ċentrifugazzjoni f'madwar 4 000 g (dwar 40 000 m sec^{-2}) għal 15-il minuta.

DIC: Karbonju inorganiku maħlul.

ThIC: Karbonju inorganiku teoretiku

TIC: Karbonju organiku totali

Bijodegradabbli faċilment: Klassifikazzjoni arbitrarja tal-kimiċi li għaddew ċerti testijiet speċifiċi tal-iskrining għall-bijodegredabbiltà ultima; dawn it-testijiet tant huma stretti li huwa assunt li tali kimiċi se jibbijodegredaw malajr u kompletament f'ambjenti akkwatiċi taħt kondizzjonijeit aerobiċi.

Perjodu ta' 10-d: L-10 ijiem li jsegwu immedjatament il-kisba t'a 10 % bijodegredazzjoni.

Bijodegradabbiltà inerenti: Klassifikazzjoni tal-kimiċi li għalihom hemm evidenza inekwivoka ta' bijodegredazzjoni (primarja jew ultima) fi kwalunkwe test ta' bijodegradabbiltà.

Bijodegradazzjoni aerobika ultima: Il-livell ta' degradazzjoni miksuba meta il-kimika għall-ittestjar tiġi totalment utilizzata minn mikroorganiżmi li jirriżultaw fil-produzzjoni tad-dijossidu tal-karbonju, l-ilma, imluħa minerali u kostitwenti ċellulari mikrobjali ġodda (bijomassa).

Mineralizzazzjoni: Mineralizzazzjoni hija d-degradazzjoni kompleta ta' kimika organika għal CO_2 u H_2O f'kondizzjonijiet aerobiċi, u għal CH_4, CO_2 u H_2O f'kondizzjonijiet anaerobiċi.

Fażi ta' intervalli: Iż-żmien mill-bidu ta' test sa akklimatazzjoni u/jew adattament tal-mikroorganiżmi qed jiddegradaw ikun intlaħaq u l-grad ta' bijodegradazzjoni ta' kimika għall-ittestjar jew ta' materja organika jkun żdied sa livell li wieħed ikun jista' jinduna bih (p. eż. 10 % tal-bijodegradazzjoni teoretika massima, jew aktar baxxa, skont kemm tkun akkurata t-teknika tal-kejl).

Fażi ta' degradazzjoni: Iż-żmien mit-tmiem tal-perjodu ta' intervalli saż-żmien meta jkun intlaħaq 90 % tal-livell massimu ta' degradazzjoni.

Fażi ta' livell kostanti: Faża ta' livell kostanti hija l-faża li fiha d-degradazzjoni tilħaq l-aqwa tagħha u l-kurva tal-bijodegradazzjoni tkun sabet il-livell tagħha.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

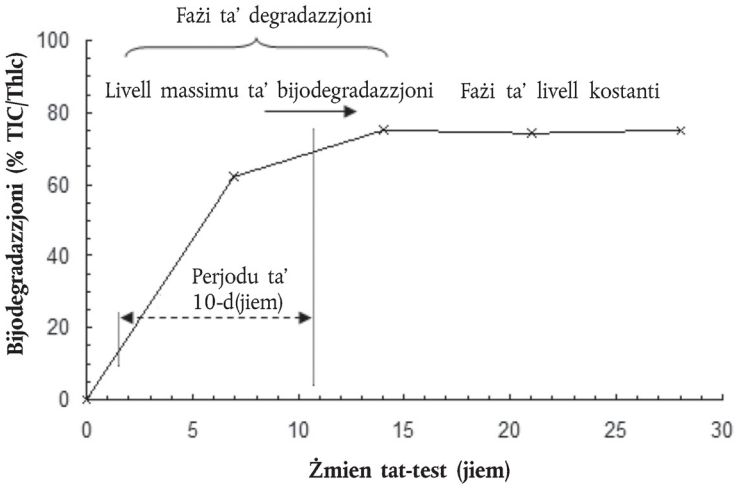
▼M4

Appendiċi 2

Eżempju ta' kurva ta' bijodegradazzjoni

Figura 1

Bijodegradazzjoni ta' ottanol-1 fit-test ta' Spazju Fuq ta' CO_2 Glossarju



Biodegradation:

Bijodegradazzjoni:

Fażi ta' degradazzjoni:

Livell massimu ta' bijodegradazzjoni:

Fażi ta' livell kostanti:

Perjodu ta' 10-d(jiem):

Żmien tat-test (jiem):

▼M4

C.30. AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' OLIGOCHAETES TERRESTRI

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 317 (2010) tal-OECD. Fost il-Metodi ta' Ttestjar relatati ma' dak li jseħħ fl-ambjent, il-Konċentrazzjoni Bijoloġika: Test ta' Fluss Kontinwu tal-Ħut (il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness (49)) u l-Akkumulazzjoni bijoloġika ta' Oligochaetes tal-Qiegħ li jgħixu f'sediment (53) kienu ppubblikati fl-1996 u fl-2008 rispettivament. L-estrapolazzjoni ta' dejta dwar akkumulazzjoni bijoloġika akwatika għal organiżmi terrestri bħal ħniex hija diffiċli, jekk possibbli wara kollox. Kalkulazzjonijiet mudelli bbażati fuq il-lipofiliċità ta' kimika għall-ittestjar, eż. (14) (37), bħalissa jintużaw għall-valutazzjoni ta' akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimiċi fil-ħamrija, bħal eż. fid-Dokument ta' Gwida Teknika tal-UE (19). Il-ħtieġa ta' metodu ta' ttestjar speċifiku għal kompartiment diġà kienet indirizzata, eż. (55). Metodu bħal dan huwa l-aktar importanti għall-evalwazzjoni ta' vvelenar sekondarju f'katini terrestri tal-ikel (4). Diversi metodi ta' testijiet nazzjonali jindirizzaw il-kwistjoni ta' akkumulazzjoni bijoloġika f'organiżmi minbarra l-ħut, eż. (2) u (72). Metodu dwar il-kejl ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn ħamrija kontaminata fi ħniex (*Eisenia fetida*, Savigny) u f'dud abjad kien żviluppat mill-American Society for Testing and Materials (3). Metodu aċċettat internazzjonalment għad-determinazzjoni ta' akkumulazzjoni bijoloġika f'ħamrija mħallta għandu jtejjeb il-valutazzjoni tar-riskju ta' kimiċi f'ekosistemi terrestri eż. (25) (29).

2. Invertebrati li jiddiġerixxu l-ħamrija huma esposti għal kimiċi li jkunu fil-ħamrija. Fost dawn l-annimali, oligochaetes terrestri jaqdu rwol importanti fl-istruttura u l-funzjoni tal-ħamrija (15) (20). Oligochaetes terrestri jgħixu fil-ħamrija u parzjalment fil-wiċċ tal-ħamrija (l-aktar fis-saff taż-żibel); ta' sikwit jirrappreżentaw l-ispeċi l-aktar abbundanti f'termini ta' bijomassa (54). Bit-taqlib bijoloġiku tal-ħamrija u billi jservu ta' priża dawn l-annimali jista' jkollhom influwenza kbira biex bijoloġikament ikun hemm kimiċi għal organiżmi oħra bħal invertebrati (eż. araknidi predaturi u ħanfus; eż. (64)) jew predaturi vertebrati (eż. volpijiet u gawwi) (18) (62). Xi speċijiet ta' oligochaetes terrestri bħalissa użati f'ittestjar ekotossikoloġiku huma deskritti fl-Appendiċi 5.

3. Il-Gwida Standard ASTM biex Isiru Testijiet fil-Laboratorju għal Tossiċità fil-Ħamrija jew Akkumulazzjoni Bijoloġika bil-Ħanex Lumbriċida *Eisenia fetida* u bil-Ħanex l-Abjad Enchytraeid *Enchytraeus albidus* (3) tipprovdi ħafna dettalji essenzjali u utli għal dak li jagħmel bħalissal-Metodu ta' Ttestjar dwar l-akkumulazzjoni bijoloġika fil-ħamrija. Aktar dokumenti li ssir referenza għalihom f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huma l-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness, Konċentrazzjoni Bijoloġika: Test ta' Fluss Kontinwu tal-Ħut (49) u OECD TG 315: Akkumulazzjoni Bijoloġika f'Oligochates tal-Qiegħ li jgħixu f'sediment (53). Esperjenza prattika fi studji u pubblikazzjonijiet mil-letteratura dwar akkumulazzjoni bijoloġika ta' ħamrija, eż. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79) hija wkoll għajn ewlenija ta' informazzjoni għal dan il-Metodu ta' Ttestjar.

4. Dan il-metodu ta' Ttestjar japplika l-aktar għal kimiċi organiċi stabbli u newtrali li jittendu li jassorbixxu mill-ħamrija. Ittestjar għal akkumulazzjoni bijoloġika f'komposti metallorganiċi assoċjati mal-ħamrija, stabbli, jista' jkun possibbli ma' dan il-Metodu ta' Ttestjar. Huwa wkoll applikabbli għal metalli u għal mikroelementi.

PREREKWIŻIT

5. Testijiet biex titkejjel il-akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimika f'oligochaetes terrestri saru b'metalli tqal (ara eż. (63)) u b'kimiċi persistenti, oganiċi li għandhom valuri log Kow bejn 3.0 u 6.0 eż. (40). Testijiet bħal dawn japplikaw ukoll għal:

— kimiċi li juru log K_{ow} ta' aktar minn 6.0 (kimiċi superidrofobiċi);

▼M4

— kimiċi li jappartienu lil klassi ta' kimiċi organiċi magħrufin li għandhom il-potenzjal jakkumulaw bijoloġikament f'organiżmi ħajjin, eż. kimiċi attivi fil-wiċċ jew li jassorbixxu ħafna;

— kimiċi li jindikaw il-potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika minn karatteristiċi strutturali, eż. analogi ta' kimiċi b'potenzjal magħruf għal akkumulazzjoni bijoloġika; u

— Metalli.

6. Informazzjoni dwar il-kimika għall-ittestjar bħal isem komuni, isem tal-kimika (preferibbilment isem IUPAC), formula strutturali, numru tar-reġistru tal-CAS, purezza, prekawzjonijiet ta' sikurezza, kondizzjonijiet ta' ħżin adatti u metodi analitiċi għandhom jinkisbu qabel ma jinbeda l-istudju. Barra minn dan, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja:

(a) solubilità fl-ilma;

(b) koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma, $K_{ow;}$

(c) koeffiċjent tal-partizzjoni ħamrija-ilma, espress bħala $K_{oc;}$

(d) pressjoni tal-fwar;

(e) degradabbiltà (eż. fil-ħamrija, ilma);

(f) metaboliti magħrufin.

7. Jistgħu jintużaw kimiċi għall-ittestjar b'tikketa radju jew mhux b'tikketta radju. Iżda biex l-analiżi titħaffef huwa rrakkomandat li tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radju. Id-deċiżjoni ssir abbażi tal-limiti ta' detezzjoni jew ta' rekwiżit biex jitkejlu kimika għall-ittestjar u metaboliti prinċipali. Jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radju u jitkejlu residwi radjuattivi totali, huwa importanti li r-residwi b'tikketta radju kemm fil-ħamrija kif ukoll fl-organiżmi tat-test ikunu kkaratterizzati għal perċentwali ta' kimika prinċipali tat-test u b'tikketta li ma jkunux prinċipali, eż. f'kampjuni meħudin fi stat regolari jew fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment, biex titħalla ssir kalkulazzjoni ta' fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika (BAF) għall-kimika prinċipali tat-test u għal metaboliti tal-ħamrija ta' tħassib (ara l-paragrafu 50). Il-metodu deskritt hawn jista' jkollu jiġi mmodifikat, eż., biex jipprovdi bijomassa suffiċjenti, biex ikejjel kimiċi għall-ittestjar jew ta' metalli mingħajr tikketta radju. Meta jitkejlu residwi radjuattivi totali (billi tingħadd xintillazzjoni likwida wara estrazzjoni, kombustjoni jew taħlil ta' tessuti), il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika jkun ibbażat fuq il-kimika prinċipali tat-test u tal-metaboliti. Il-kalkulazzjoni tal-BAF preferibbilment għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni tal-kimika prinċipali tat-test fl-organiżmi u f'residwi radjuattivi totali. Sussegwentement, il-fattur ta' akkumulazzjoni bijota-ħamrija (BSAF), normalizzat għall-kontenut ta' lipidi ta' kontenut ta' dud u ta' karbonju organiku (OC) ta' ħamrija għandu jkun ikkalkulat mill-BAF għal raġunijiet ta' tqabbil bejn riżultati minn testijiet differenti ta' akkumulazzjoni bijoloġika.

8. It-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għall-ispeċijiet użati fit-test għandha tkun magħrufa, eż. konċentrazzjoni ta' effetti (ECx) jew konċentrazzjoni letali (LCx) għaż-żmien tal-fażi ta' assorbiment (eż. (19)). Il-konċentrazzjoni magħżula tal-kimika għall-ittestjar preferibbilment għandha tkun madwar 1 % ta' LC_{50}, asimptotika akuta tagħha, u mill-anqas għaxar darbiet aktar ogħla mil-limitu tal-detezzjoni tagħha fil-ħamrija bil-metodu analitiku użat. Jekk ikunu disponibbli, għandha tingħata preferenza lil valuri ta' tossiċità derivati minn studji fit-tul dwar punti ta' tmiem subletali (51) (52). Jekk dejta bħal din ma tkunx disponibbli, test għal tossiċita akuta għandu jipprovdi informazzjoni utli (ara eż. (23)).

▼M4

9. Metodu analitiku adatt ta' akkuratezza, preċiżjoni u sensittività magħrufa għall-kwantifikazzjoni tal-kimika fis-soluzzjonijiet tat-testijiet, fil-ħamrija, u fil-materjal bijoloġiku għandu jkun disponibbli, flimkien ma' dettalji dwar tħejjija u ħżin ta' kampjuni, kif ukoll skedi materjali ta' dejta ta' sikurezza. Limiti analitiċi ta' detezzjoni tal-oġġett tat-test fil-ħamrija u f'tessut ta' dud ukoll għandhom ikunu magħrufin. Jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta 14C, ir-radjuattività speċifika (jiġifieri Bq mol-1) u l-perċentwali ta' radjuattività assoċjat ma' impuritajiet għandhom ikun magħrufa. Ir-radjuattività speċifika tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun għolja biżżejjed biex tiffaċilità analiżi, u l-konċentrazzjonijiet tat-test użati m'għandhomx jirriżultaw f'effetti tossiċi.

10. It-test jista' ssir b'ħamrija artifiċjali jew b'ħamrija naturali. Informazzjoni dwar karatteristiċi tal-ħamrija naturali użata, eż. l-oriġni tal-ħamrija jew il-kostitwenti tagħha, pH, kontenut ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partiċelli (perċentwali ta' ramel, fajd u tafal), u kemm tkun kapaċi żżomm ilma (WHC), għandha tkun magħrufa qabel ma jibda t-test (3) (48).

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Il-parametri li jikkaratterizzaw il-akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar jinkludu l-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika (BAF), il-kostant tar-rata ta' assorbiment (k_s) u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e). Definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

12. It-test jikkonsisti f'żewġ fażijiet: il-fażi ta' assorbiment (espożizzjoni) u l-fażi ta' eliminazzjoni (wara espożizzjoni). Matul il-fażi ta' assorbiment, gruppi replikati ta' dud ikunu esposti għall-ħamrija, li tkun tħalltet mal-kimika għall-ittestjar. Flimkien mal-annimali tat-test, gruppi ta' dud ta' kontroll jinżammu f'kondizzjonijiet identiċi mingħajr il-kimika għall-ittestjar. Jitkejlu l-piż fin-niexef u l-kontenut ta' lipidi tal-organiżmi tat-test. Dan jista' jsir billi jintuża dud tal-grupp ta' kontroll. Jistgħu jinkisbu valuri ta' sfond analitiku (in bjank) billi jkunu analizzati kampjuni tad-dud ta' kontroll u tal-ħamrija. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud jiġi ttrasferit għal ħamrija ħielsa mill-kimika għall-ittestjar. Fażi ta' eliminazzjoni hija dejjem meħtieġa sakemm l-assorbiment tal-kimika għall-ittestjar matul il-fażi ta' espożizzjoni ma jkunx insinifikanti. Fażi ta' eliminazzjoni tipprovdi informazzjoni dwar ir-rata li biha l-kimika għall-ittestjar tinħareg 'il barra bħal ħmieġ mill-ġisem mill-organiżmi tat-test (eż. (27)). Jekk ma jkunx intlaħaq stat regolari matul il-fażi ta' assorbiment, id-determinazzjoni tal-parametri kinetiċi – fattur BAFk ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika, kostant(i) ta' rati ta' assorbiment u eliminazzjoni – għandha preferibbilment tkun ibbażata fuq l-issettjar simultanju tar-riżultati tal-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fid-dud u fuqu tkun immonitorjata t-tul kollu taż-żewġ fażijiet tat-test.

13. Matul il-fażi ta' assorbiment, jittieħdu kejlijiet ta' teħid ta' kampjuni sa 14-il jum (enchytraeids) jew 21 jum (ħniex) sakemm jintlaħaq l-istat regolari (11) (12) (67). L-istat regolari jseħħ meta grafika tal-konċentrazzjoni f'dud mal-ħin tkun parallela mal-assi tal-ħin, u tliet analiżi suċċessivi ta' konċentrazzjoni magħmulin fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' mill-anqas jumejn ma jvarjawx aktar minn ± 20 % waħda mill-oħra abbażi ta' tqabbiliet ta' statistika (eż. analiżi ta' varjanza, analiżi ta' rigressjoni).

14. Il-fażi ta' eliminazzjoni tikkonsisti fit-trasferiment tal-organiżmi tat-test għal reċipjenti li jkun fihom l-istess substrat mingħajr il-kimika għall-ittestjar. Matul il-fażi ta' eliminazzjoni, jittieħdu kejlijiet f'ħinijiet ta' teħid ta' kampjuni matul 14-il jum (enchytraeids) jew 21 jum (ħniex) sakemm determinazzjoni analitika ta' qabel tkun uriet tnaqqis ta' 90 % tar-residwi tal-kimika għall-ittestjar f'dud. Il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fid-dud fit-tmiem tal-fażi ta' eliminazzjoni tkun irrapportata bħala residwi mhux

▼M4

eliminati. Il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika tal-istat regolari (BAFss) ikun ikkalkulat preferibbilment kemm bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjoni f'dud (Ca) kif ukoll fil-ħamrija (Cs) fi stat regolari apparenti, u bħala fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika, BAFK, bħala l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' assorbiment mill-ħamrija (ks) u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (ke) (ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet) jekk wieħed jassumi kinetika tal-ewwel ordni (ara l-Appendiċi 2 għal kalkulazzjonijiet). Jekk kinetika tal-ewwel ordni ovvjament ma tkunx applikabbli, għandhom jintużaw mudelli oħra.

15. Il-kostant tar-rata ta' assorbiment, il-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (jew kostanti, fejn kienu involuti mudelli oħra), il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika (BAFK), u meta jkun possibbli, il-limiti ta' kunfidenza ta' kull wieħed minn dawn il-parametri jkunu kkalkulati minn ekwazzjonijiet mudelli kompjuterizati (ara l-Appendiċi 2 għal gwida). L-idoneità ta' kull mudell tista' tkun iddeterminata minn eż. il-koeffiċjent ta' korrelazzjoni jew mill-koeffiċjent ta' determinazzjoni (koeffiċjenti qrib ta' wieħed jindikaw idoneità) jew chi-kwadrat. Id-daqs ukoll tal-iżball standard jew il-limitu ta' kunfidenza madwar il-parametri stmati jistgħu jkunu indikattivi tal-idoneità tal-mudell.

16. Biex titnaqqas il-varjabbiltà f'riżultati ta' testijiet għal kimiċi għall-ittestjar b'lipofiliċità għolja, fatturi ta' akkumulazzjoni bijoloġika għandhom ikunu espressi b'rabta mal-kontenut ta' lipidi u mal-kontenut ta' karbonju organiku (kg ta' karbonju organiku ta' ħamrija (OC) kg-1 kontenut ta' lipidi ta' dud). Dan l-approċċ huwa bbażat fuq il-fatt li għal xi klassijiet ta' kimika, hemm relazzjoni ċara bejn il-potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika u l-lipofiliċità; dan kien stabbilit sewwa għall-ħut (47). Hemm relazzjoni bejn il-kontenut ta' lipidi ta' ħut u l-akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimiċi bħal dawn. Għal organiżmi tal-qiegħ, instabu korrelazzjonijiet simili, eż. (30) (44). Bl-istess mod għal oligochaetes terrestri ntweriet din il-korrelazzjoni, eż. (5) (6) (7) (14). Jekk ikun disponibbli tessut suffiċjenti ta' dud, il-kontenut ta' lipidi tal-annimali tat-test jista' jkun iddeterminat fuq l-istess materjal bijoloġiku bħal dak użat biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Alternattivament, jistgħu jintużaw annimali ta' kontroll biex jitkejjel il-kontenut ta' lipidi.

VALIDITÀ TAT-TEST

17. Biex test ikun validu għandhom jitħarsu l-kriterji li ġejjin kemm għal kontrolli kif ukoll għal trattamenti:

— Fit-tmiem tat-test, il-mortalità globali matul assorbiment u l-fażi ta' eliminazzjoni m'għandhomx ikunu aktar minn 10 % (ħniex) jew 20 % (enchytraeids) tal-għadd totali tad-dud introdott.

— Għal *Eisenia fetida* u *Eisenia andrei*, it-telf medju ta' massa kif imkejjel fit-tmiem tal-assorbiment u fit-tmiem tal-fażi ta' eliminazzjoni m'għandux ikun aktar minn 20 % mqabbel mal-piż ġdid inizjali (f.w.) fil-bidu ta' kull fażi.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Speċi tat-test

18. Diversi speċijiet ta' oligochaetes terrestri huma rrakkomandati għal ittestjar ta' akkumulazzjoni bijoloġika. L-ispeċijiet komunement l-aktar użati Eisenia fetida jew Eisenia andrei (Lumbricidae), jew Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus, jew Enchytraeus luxuriosus (Enchytraeidae)) huma deskritti fl-Appendiċi 5.

▼M4

Apparat

19. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat l-użu ta' materjali, għall-partijiet kollha tat-tagħmir, li jistgħu jinħallu, jassorbixxu l-kimika għall-ittestjar jew ilissu kimiċi oħra, u jkollhom effett ħażin fuq l-annimali tat-test. Reċipjenti standard rettangolari jew ċilindriċi, magħmulin minn materjal kimikament inerti u ta' kapaċità adatta jistgħu jintużaw b'konformità mar-rata ta' tagħbija, jiġifieri mal-għadd ta' dud tat-test. Jistgħu jintużaw azzar inossidabbli, plastik jew ħġieġ għal kull tagħmir li jkollu kuntatt mal-midja tat-test. It-reċipjenti tat-test għandhom ikunu mgħottijin kif jixraq biex id-dud ma jitħalliex jaħrab, filwaqt li titħalla provvista suffiċjenti ta' arja. Għal kimiċi b'koeffiċjenti għoljin ta' sorbiment, bħal piretrojdi sintetiċi, jista' jkun meħtieġ ħġieġ sinalizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet it-tagħmir ikollu jitwarrab wara li jintuża (49). Oġġetti tat-test u kimiċi volatili b'tikketta radju m'għandhomx jitħallew jaħarbu. Għandhom ikunu użati sifuni (eż. fliexken tal-ħġieġ għal ħasil bil-gass) li jkun fihom assorbenti adatti biex iżommu kull residwu milli jevapora mir-reċipjenti tat-test.

Ħamrija

20. Il-ħamrija tat-test għandha tkun ta' kwalità li tippermetti s-sopravivenza u preferibbilment ir-riproduzzjoni tal-organiżmi tat-test għal kemm idumu l-akklimatazzjoni u l-perjodi ta' testijiet mingħajr dawn ma juru ebda dehra jew mġiba mhux normali. Id-dud għandu jħaffer toqob fil-ħamrija.

21. Il-ħamrija artifiċjali deskritta fil-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness (48) hija rrakkomandata biex tintuża bħala s-substrat fit-testijiet. It-tħejjija tal-ħamrija artifiċjali għal użu fit-testijiet ta' akkumulazzjoni bijoloġika u rakkomandazzjonijiet għall-ħżin ta' ħamrija artifiċjali jingħataw fl-Appendiċi 4. Ħamrija artifiċjali mnixxfa bl-arja tista' tinħażen f'temperatura ambjentali sakemm tintuża.

22. Iżda ħamrija naturali minn siti mhux imniġġsa tista' sservi ta' ħamrija ta' test u/jew ta' kultura. Ħamrija naturali għandha tkun ikkaratterizzata mill-anqas minn oriġni (sit ta' ġbir), pH, kontenut ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partiċelli (perċentwali ta' ramel, fajd u tafal), kapaċità ta' żamma massima ta' ilma (WHCmax), u kontenut ta' ilma f'perċentwali (3). Analiżi tal-ħamrija jew tal-kostitwenti tagħha għal mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu għandha tipprovdi informazzjoni utli. Jekk tintuża ħamrija minn għelieqi ta' art agrikola, m'għandhiex tkun ġiet ittrattata bi prodotti ta' protezzjoni ta' għelejjel jew b'demel ta' annimali ttrattati bħala fertilizzanti għal mill-anqas sena u b'fertilizzanti organiċi għal mill-anqas sitt xhur qabel ma jittieħdu kampjuni (50). Proċeduri ta' manipulazzjoni għal ħamrija naturali qabel ma tintuża f'tests ekotossikoloġiċi ma' oligochaetes fil-laboratorju huma deskritti fi (3). Għal ħamrija naturali ż-żmien ta' ħżin fil-laboratorju għandu jinżamm qasir kemm jista' jkun.

Applikazzjoni tal-kimika għall-ittestjar

23. Il-kimika għall-ittestjar tkun inkorporata fil-ħamrija. Għandhom jitqiesu l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar. Kimika għall-ittestjar li tinħall fl-ilma għandha tiġi maħlula kompletament fl-ilma qabel ma titħallat mal-ħamrija. Il-proċedura rrakkomandata li tiffortifika għal kimika għall-ittestjar li ftit tinħall fl-ilma tinvolvi kisja waħda jew aktar tal-kostitwenti tal-ħamrija (artifiċjali) mal-kimika għall-ittestjar. Pereżempju, ir-ramel tal-quartz, jew porzjon minnu, jista' jitgħaddas b'soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'solvent organiku adatt, li wara jiġi evaporat bil-mod sakemm

▼M4

jinxef. Il-frazzjoni miksija mbagħad tkun tista' titħallat fil-ħamrija mxarrba. Il-vantaġġ kbir ta' din il-proċedura huwa li ebda solvent ma jiddaħħal fil-ħamrija. Meta tintuża ħamrija naturali, il-kimika għall-ittestjar tista' tkun iffortifikata billi porzjon ta' ħamrija mnixxef bl-arja jitħallat kif deskritt hawn fuq għall-ħamrija artifiċjali, jew billi l-kimika għall-ittestjar titħawwad fil-ħamrija mxarrba, bi stadju wara ta' evaporazzjoni jekk jintuża aġent ta' solubilità. Inġenerali, il-kuntatt ta' ħamrija mxarrba ma' solventi għandu jkun evitat kemm jista' jkun. Għandu jitqies dan li ġej (3):

— Jekk jintuża solvent minbarra ilma, huwa għandu jkun wieħed li jitħallat mal-ilma u/jew li jkun jista' jitneħħa (pereżempju, evaporat), u titħalla biss il-kimika għall-ittestjar fuq il-ħamrija.

— Jekk jintuża kontroll ta' solvent, ma jkunx hemm ħtieġa ta' kontroll negattiv. Il-kontroll ta' solvent għandu jkun fih 'il fuq mill-ogħla konċentrazzjoni ta' solvent miżjud mal-ħamrija u għandu juża solvent mill-istess lott użat biex issir is-soluzzjoni ta' stokkijiet. It-tossiċità u l-volatilità tas-solvent, u s-solubilità tal-kimika għall-ittestjar fis-solvent magħżul għandhom ikunu l-kriterji ewlenin użati għall-għażla ta' aġent ta' solubilità adatt.

24. Għal kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma u f'solventi organiċi, jistgħu jitħalltu 2,0 – 2,5 g ta' ramel quartz miħun fin għal kull reċipjent tat-test mal-kwantità ta' kimika għall-ittestjar, eż. billi jintuża mehrież u lida, biex tinkiseb il-konċentrazzjoni tat-test mixtieqa. Din it-taħlita ta' ramel tal-quartz u l-kimika għall-ittestjar jiżdiedu mal-ħamrija magħmula niedja minn qabel u mħawda sewwa b'ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut meħtieġ ta' rtuba. It-taħlita finali titqassam fir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tittenna għal kull konċentrazzjoni tat-test, u jitħejja wkoll kontroll xieraq b'2,0 – 2,5 g ta' ramel tal-quartz miħun fin għal kull reċipjent tat-test.

25. Il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija għandha tkun iddeterminata wara li tkun ġiet iffortifikata. Id-distribuzzjoni omoġenja tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija għandha tkun ivverifikata qabel ma jiddaħħlu l-organiżmi tat-test. Il-metodu użat biex tkun iffortifikata, u r-raġunijiet għall-għażla ta' proċedura li tiffortifika għandhom ikunu rrapportati (24).

26. L-ekwilibriju bejn il-ħamrija u l-fażi ta' ilma mill-pori idealment għandha tkun stabbilita qabel ma jiżdiedu l-organiżmi; huwa rrakkomandat perjodu ta' żmien ta' erbat ijiem f'20 °C. Għal ħafna kimiċi organiċi li ftit jinħallu fl-ilma ż-żmien meħtieġ biex jintlaħaq ekwilibriju veru bejn frazzjonijiet sorbiti u maħlulin jistgħu jingħaddu f'jiem jew xhur. Ikun jiddependi mill-għan tal-istudju, pereżempju meta l-kondizzjonijiet ambjentali għandhom ikunu imitati, jekk il-ħamrija fortifikata tkunx tista' "tixxejjaħ" għal perjodu itwal, eż. tliet ġimgħat għal metalli f'20 °C (22).

Kultura għall-organiżmi tat-test

27. Dud għandu preferibbilment jinżamm f'kultura permanenti tal-laboratorju. Gwida dwar metodi ta' kultura tal-laboratorju għal *Eisenia fetida* u *Eisenia andrei*, u għall-ispeċi ta' Enchytraeid, hija pprovduta fl-Appendiċi 5 (ara wkoll (48) (51) (52)).

28. Id-dud użat fit-testijiet għandu jkun ħieles minn mard, anormalitajiet u parassiti osservabbli.

PRESTAZZJONI TAT-TEST

29. L-organiżmi tat-test ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar matul il-fażi ta' assorbiment. Il-fażi ta' assorbiment għandha tkun ta' 14-il jum (enchytraeids) jew ta' 21 jum (ħniex) sakemm ma jintweriex li jkun intlaħaq stat regolari.

▼M4

30. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud ikun ittrasferit għal ħamrija ħielsa minn kimika għall-ittestjar. L-ewwel kampjun għandu jittieħed f'4 – 24 siegħa wara l-bidu tal-fażi ta' eliminazzjoni. Eżempji ta' skedi ta' teħid ta' kampjuni għal fażi ta' assorbiment ta' 21 jum u għal fażi ta' eliminazzjoni ta' 21 jum jingħataw fl-Appendiċi 3.

Organiżmi tat-test

31. Għal ħafna speċijiet ta' enchytraeids terresti l-piż ta' kull waħda minnhom huwa baxx ħafna (eż. 5-10 mg piż fl-imxarrab għal kull waħda minnhom ta' *Enchytraeus albidus* u anqas għal *Enchytraeus crypticus* jew *Enchytraeus luxuriosus*); biex isiru l-kejlijiet tal-piż u l-analiżi kimika, jista' jkun meħtieġ li jingħabar id-dud tar-reċipjenti replikati tat-test (jiġifieri jintuża d-dud kollu ta' reċipjent replikat biex jinkiseb riżultat ta' tessut analitiku wieħed). 20 enchytraeids individwali jiżdiedu għal kull replikat, u għandhom jintużaw mill-anqas tliet replikati. Jekk il-limitu analitiku ta' detezzjoni tal-kimika għall-ittestjar ikun għoli, jista' jkun meħtieġ aktar dud. Għal speċi tat-test b'piż ogħla ta' kull speċi waħidha (*Eisenia fetida* u *Eisenia andrei*), jistgħu jintużaw reċipjenti replikati li jkun fihom speċi waħda.

32. Il-ħniex użati f'test għandhom ikunu ta' piż simili (eż. *Eisenia fetida* u *Eisenia andrei* kull waħda minnhom għandu jkollha piż ta' 250 – 600 mg). Enchytraeids (eż. *Enchytraeus albidus*) għandu jkollhom tul ta' bejn wieħed u ieħor 1 cm. Id-dud kollu użat f'test partikolari għandu jiġi mill-istess sors, u għandhom ikunu annimali adulti bi clitellum (ara l-Appendiċi 5). Minħabba li l-piż u l-età ta' annimal jista' jkollhom effett fuq il-valuri tal-BAF (eż. minħabba kontenut ta' lipidi li jvarja u/jew għax ikun hemm bajd), dawn il-parametri għandhom ikunu rreġistrati b'mod akkurat u jitqiesu fl-interpretazzjoni ta' riżultati. Barra minn dan, fosdqiet jistgħu jkunu ddepożitati matul il-perjodu ta' espożizzjoni, li jkollu wkoll impatt fuq il-valuri tal-BAF. Huwa rrakkomandat li kampjun sekondarju tad-dud tat-test jintiżen qabel it-test biex ikunu stmati l-piżijiet medji fl-imxarrab u fin-niexef.

33. Għandu jintuża proporzjon għoli ta' ħamrija ma' dud biex ikun imminimizzat it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija matul il-fażi ta' assorbiment. Għal *Eisenia fetida* u *Eisenia andrei* huwa rrakkomandat ammont minimu ta' piż fin-niexef ta' 50 g (d.w.) ta' ħamrija għal kull dudu, u għal enchytraeids, minimu ta' 10-20 g d.w. ta' ħamrija għal kull reċipjent tat-test. Ir-reċipjenti għandu jkun fihom saff ħamrija ta' 2-3 cm (enchytraeids) jew 4-5 cm (ħniex).

34. Id-dud użat f'test jitneħħa mill-kultura (eż. enchytraeids billi jintużaw pinzetti ta' ġojjellier). Annimali adulti jkunu ttrasferiti għal ħamrija tat-test mhux ittrattata għal akklimatazzjoni, u mitmugħa (ara l-paragrafu 36). Jekk il-kondizzjonijiet tat-test ikunu differenti mill-kondizzjonijiet tal-kultura, fażi ta' akklimatazzjoni ta' 24-72 siegħa għandha tkun suffiċjenti biex id-dud jadatta għall-kondizzjonijiet tat-test. Wara akklimatazzjoni, il-ħniex jitlaħalħu billi jkunu ttrasferiti għal dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet Petri) li jkun fihom ilma nadif, u wara jintiżnu qabel ma jiżdiedu mal-ħamrija tat-test. Qabel l-użin, għandu jitneħħa ilma żejjed mid-dud billi d-dud jintmess max-xifer tad-dixx jew ikun ixxugat bil-mod sakemm jinxef bl-użu ta' xugaman tal-karta ftit niedi.

35. Il-mod kif organismi tat-test iħaffru toqob għandu jkun osservat u rreġistrat. F'testijiet bi ħniex, l-annimali (kontroll u trattamenti) normalment itaqqbu toqob fil-ħamrija f'perjodu ta' ftit sigħat; dan għandu jkun ivverifikat mhux aktar tard minn 24 siegħa wara li jiżdied id-dud fir-reċipjenti tat-test. Jekk il-ħniex jonqsu milli jħaffru toqob fil-ħamrija (eż. aktar minn 10 % għal aktar

▼M4

min-nofs tal-fażi ta' assorbiment), dan jindika li jew il-kondizzjonijiet tat-test ma jkunux adatti jew li l-organiżmi tat-test ma jkunux f'saħħithom. F'każ bħal dan it-test għandu jitwaqqaf u jittenna. Enchytraeids jgħixu l-aktar fil-pori interstizjali tal-ħamrija, u sikwit il-qoxra ta' barra tagħhom tista' tkun parzjalment biss f'kuntatt mas-substrat tal-madwar; espożizzjoni ta' enchytraeids li jħaffru toqob u dawk li ma jħaffrux toqob tkun preżunta li hija ekwivalenti u enchytraeids li ma jħaffrux toqob mhux bilfors jeħtiġilhom li t-test jittenna.

Tmigħ

36. Tmigħ għandu jkun ipprospettat meta tintuża ħamrija b'kontenut ta' karbonju organiku totali baxx. Meta tintuża ħamrija artifiċjali, hija rrakkomandata rata ta' tmigħ darbtejn fil-ġimgħa (jiġifieri d-dud għandu jintema' darba fil-ġimgħa) ta' 7 mg ta' rawt niexef għal kull g ħamrija piż fin-niexef għal ħniex, u rata kull ġimgħa ta' 2-2,5 mg ta' trofof ta' ħafur miżħun għal kull g ħamrija piż fin-niexef għal enchytraeids (11). L-ewwel razzjon ta' ikel għandu jitħallat mal-ħamrija minnufih qabel ma' jiżdiedu l-organiżmi tat-test. Preferibbilment għandu jintuża l-istess tip ta' ikel bħal dak fil-kulturi (ara l-Appendiċi 5).

Dawl u temperatura

37. It-testijiet għandhom isiru taħt ċiklu kkontrollat ta' 16/8 sigħat dawl/dlam, preferibbilment ta' 400 sa 800 lx fl-erja tat-reċipjenti tat-test (3). It-temperatura tat-test għandha tkun 20 ± 2 °C matul it-test kollu.

Konċentrazzjonijiet tat-test

38. Tintuża konċentrazzjoni waħda. Sitwazzjonijiet fejn konċentrazzjoni(jiet) addizzjonali tkun/ikunu meħtieġa għandhom ikunu ġġustifikati. Jekk it-tossiċità (ECx) tal-kimika għall-ittestjar tkun qrib il-limitu ta' detezzjoni analitika, huwa rrakkomandat l-użu ta' kimika għall-ittestjar b'tikketta radju b'radjuattività speċifika għolja. Għal metalli, il-konċentrazzjoni għandha tkun 'il fuq mil-livell tal-isfond fit-tessut u fil-ħamrija.

Replikati

39. Għal kejlijiet kinetiċi (fażi ta' assorbiment u eliminazzjoni), l-għadd minimu ta' reċipjenti replikati ttrattati għandu jkun tlieta għal kull punt ta' teħid ta' kampjuni. L-għadd totali ta' replikati mhejjija għandu jkun suffiċjenti biex ikopri l-ħinijiet kollha ta' teħid ta' kampjuni matul l-assorbiment u l-fażi ta' eliminazzjoni.

40. Għall-osservazzjonijiet u l-kejl bijoloġiċi (eż. proporzjon ta' piż minn fin-niexef għal fl-imxarrab, kontenut ta' lipidi) u għall-analiżi ta' konċentrazzjonijiet ta' bażi f'dud u fil-ħamrija, għandhom ikunu pprovduti mill-anqas 12-il reċipjent replikat ta' kontroll negattiv (erbgħa li jkun itteħdilhom kampjun fil-bidu, erbgħa fit-tmiem ta' assorbiment, u erbgħa fit-tmiem ta' eliminazzjoni) jekk ma jkun użat ebda solvent minbarra ilma. Jekk jintuża xi aġent ta' solubilità għall-applikazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, għandu jsir kontroll ta' solvent (erbgħa reċipjenti replikati għandu jitteħdilhom kampjun fil-bidu, erbgħa fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment u erbgħa fit-tmiem tal-fażi ta' eliminazzjoni) li jkun fih il-kostitwenti kollha ħlief għal oġġett tat-test flimkien mar-replikati ttrattati. F'dan il-każ, jistgħu wkoll ikunu pprovduti erbgħa reċipjenti replikati addizzjonali ta' kontroll negattiv (ebda solvent) għal teħid fakultattiv ta' kampjuni fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment. Dawn ir-replikati jistgħu jitqabblu bijoloġikment mal-kontroll ta' solvent biex tinkiseb informazzjoni dwar influwenza li jista' jkun hemm tas-solvent fuq l-organiżmi tat-test. Huwa rrakkomandat li jkun stabbilit għadd suffiċjenti ta' reċipjenti replikati riżervati addizzjonali (eż. tmienja) għal trattament u kontroll(i).

▼M4

Frekwenza ta' kejl tal-kwalità tal-ħamrija

41. Il-pH tal-ħamrija, il-kontenut ta' rtuba fil-ħamrija u t-temperatura (kontinwament) fil-kamra tat-test għandhom jitkejlu fil-bidu u fit-tmiem tal-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Darba fil-ġimgħa l-kontenut ta' rtuba fil-ħamrija għandu jkun ikkontrollat billi jintiżnu r-reċipjenti tat-test u l-piżijiet attwali jitqabblu ma' piżijiet inizjali fil-bidu tat-test. Telf ta' ilma għandu jkun ikkumpensat biż-żieda ta' ilma dejonizzat.

Teħid ta' kampjuni u analiżi ta' dud u ta' ħamrija

42. Eżempju ta' skeda għall-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni f'testijiet ta' akkumulazzjoni bijoloġika ta' ħniex u enchytraeid tingħata fl-Appendiċi 3.

43. Il-ħamrija jitteħdilha kampjun mir-reċipjenti tat-test biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar qabel ma jiddaħħal id-dud, u matul il-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Matul it-test il-konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar ikunu ddeterminati fid-dud u fil-ħamrija. Inġenerali, konċentrazzjonijiet totali ta' ħamrija jitkejlu. B'mod fakultattiv, konċentrazzjonijiet f'ilma tal-pori jistgħu jitkejlu; f'każ bħal dan, għandhom ikunu pprovduti motiv u metodi adatti qabel ma jinbeda studju, u jkunu inklużi fir-rapport.

44. Id-dud u l-ħamrija jitteħdulhom kampjun mill-anqas f'sitt okkażjonijiet matul il-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Jekk tintwera l-istabbiltà ta' kimika għall-ittestjar, l-għadd ta' analiżi tal-ħamrija jista' jitnaqqas. Huwa rrakkomandat li ssir analiżi mill-anqas ta' tliet replikati fil-bidu u fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment. Jekk il-konċentrazzjoni fil-ħamrija mkejla fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment tmur lil hinn mill-konċentrazzjoni tal-bidu b'aktar minn 30 %, il-kampjuni tal-ħamrija meħudin f'dati oħra wkoll għandhom ikunu analizzati.

45. Neħħi d-dud ta' replikat partikolari mill-ħamrija f'kull ħin ta' teħid ta' kampjuni (eż. wara li tkun ferrixt il-ħamrija tar-replikat f'dixx baxx u erfajt id-dud bl-użu ta' pinzetti rotob tal-ġojjellier), laħlaħhom malajr bl-ilma f'dixx baxx tal-ħġieġ jew tal-azzar. Neħħi ilma żejjed (ara l-paragrafu 34). Ittrasferixxi d-dud b'attenzjoni għal ġo reċipjent li jkun intiżen minn qabel, iżinhom fil-pront, inkluż il-kontenut tal-imsaren.

46. Il-ħniex (*Eisenia* sp.) għandhom imbagħad jitħallew inaddfu msarinhom matul l-lejl eż. fuq filtru niedi tal-karta f'dixx Petri mgħotti (ara l-paragrafu 34). Wara t-tindif, il-piż tad-dud għandu jkun iddeterminat biex ikun ivvalutat tnaqqis jekk jista' jkun fil-bijomassa matul it-test (ara l-kriterji tal-validità fil-paragrafu 17). Użin u analiżi ta' tessut ta' Enchytraeids isir mingħajr tindif, għax dan huwa teknikament diffiċli minħabba d-daqs żgħir ta' dan id-dud. Wara determinazzjoni finali tal-piż, id-dud għandu jinqatel minnufih, billi jintuża l-metodu l-aktar adatt (eż. billi jintuża nitroġenu likwidu, jew iffriżar taħt -18 °C).

47. Matul il-faži ta' eliminazzjoni, id-dud jissostitwixxi kontenut ta' msaren kontaminati b'ħamrija nadifa. Dan ifisser li kejlijiet ta' dud mhux nadif (enchytraeids f'dan il-kuntest) li jkun itteħidlu kampjun minnufih qabel il-faži ta' eliminazzjoni jinkludi ħamrija b'imsaren kontaminati. Għal oligochaetes akwatiċi huwa preżunt li wara 4 – 24 siegħa inizjali tal-faži ta' eliminazzjoni, il-kontenut kważi kollu ta' msaren kontaminati jkun ġie sostitwit b'sediment nadif, eż. (46). Sejbiet simili kienu rrapportati għal ħniex fi studji dwar l-akkumulazzjoni ta' kadmju u żingu b'tikketta radju (78). F'enchytraeids mhux imnaddfin, il-konċentrazzjoni ta' dan l-ewwel kampjun tal-faži ta' eliminazzjoni tista' titqies bħala l-konċentrazzjoni ta' tessuti wara t-tindif ta' msaren. Biex titqies id-dilwizzjoni tal-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test b'ħamrija mhux kontaminata matul l-faži ta' eliminazzjoni, il-piż tal-kontenut ta' msaren jista' jkun stmat mill-piż ta' dud fl-imxarrab/piż ta' rmied ta' dud jew piż ta' dud fin-niexef/proporzjonijiet ta' piżijiet ta' rmied tad-dud.

▼M4

48. Il-kampjuni tal-ħamrija u d-dud għandhom preferibbilment ikunu analizzati minnufih wara tneħħija (jiġifieri f'1-2 ijiem) biex ma jitħalliex ikun hemm degradazzjoni jew telf ieħor, u huwa rrakkomandat li jkunu kkalkulati r-rati approssimattivi ta' assorbiment u eliminazzjoni hekk kif ikun għaddej it-test. Jekk l-analiżi tiddewwem, il-kampjuni għandhom jinħażnu b'metodu adatt, eż. fil-friża (≤ -18 °C).

49. Għandu jkun ivverifikat li l-preċiżjoni u riproduċibbiltà tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-ħamrija u mill-kampjuni tad-dud ikunu sodisfaċenti għall-metodu mogħti; l-effiċjenza ta' estrazzjoni, il-limitu ta' detezzjoni (LOD) u l-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) għandhom ikunu rrapportati. Bl-istess mod għandu jkun ivverifikat li l-kimika għall-ittestjar ma tkunx tista' tinqabad fir-reċipjenti ta' kontroll f'konċentrazzjonijiet ogħla minn ta' sfond. Meta l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-organiżmu tat-test Ca tkun > 0 fid-dud ta' kontroll, din għandha tkun inkluża fil-kalkulazzjoni tal-parametri kinetiċi (ara l-Appendiċi 2). Il-kampjuni kollha għandhom ikunu ttrattati matul it-test kollu biex ikunu mminimizzati l-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw minn sorbiment tal-kimika għall-ittestjar fuq l-apparat ta' teħid ta' kampjuni).

50. Meta jsir xogħol fuq kimiċi għall-ittestjar b'tikketta radju, ikun possibbli ssir analiżi ta' kimiċi prinċipali u metaboliti. Kwantifikazzjoni ta' kimika prinċipali tat-test u metaboliti fi stat regolari jew fit-tmiem tal-faži ta' assorbiment tipprovdi informazzjoni importanti. Il-kampjuni għandhom imbagħad "jitnaddfu" biex il-kimika prinċipali tat-test tkun tista' tiġi kkwantifikata separatament. Jekk metabolita waħedha taqbeż 10 % tar-radjuattività totali fil-kampjun(i) analizzat(i), hija rrakkomandata l-identifikazzjoni ta' dawn il-metaboliti.

51. L-irkupru globali, u l-irkupru ta' kimika għall-ittestjar f'dud, fil-ħamrija, u jekk jintużaw, f'sifuni li jkun fihom assorbenti biex iżommu kimika għall-ittestjar evaporata, għandhom ikunu rreġistrati u rrapportati.

52. Il-ġbir flimkien ta' dawk li jitneħħdilhom kampjun minn reċipjent partikolari tat-test huwa aċċettabbli għal dud enchytraeid li jkunu iżgħar mill-ħniex. Jekk ġbir ikun jinvolvi t-tnaqqis tal-għadd ta' replikati, dan jillimita l-proċeduri ta' statistika li jistgħu jkunu applikati għad-dejta. Jekk ikunu meħtieġa proċedura u poter speċifiċi ta' statistika, f'dak il-każ għandu jkun inkluż għadd adegwat ta' reċipjenti replikati tat-test fit-test biex jakkomoda l-ġbir, il-proċedura u l-poter mixtieqa.

53. Huwa rrakkomandat li l-BAF ikun espress kemm bħala funzjoni ta' piż totali fin-niexef, kif ukoll, meta meħtieġ (jiġifieri għal kimiċi idrofobiċi ħafna), bħala funzjoni tal-kontenut ta' lipidi. Għandhom jintużaw metodi adatti għad-determinazzjoni ta' kontenut ta' lipidi (xi metodi li jeżistu diġà – eż. (31) (58) – għandhom ikunu adattati għal dan il-fini). Dawn il-metodi jużaw teknika ta' estrazzjoni tal-kloroform/metanol. Iżda biex ikun evitat l-użu ta' solventi bil-klorur, għandha tintuża modifika tal-metodu ta' Bligh u Dyer (9) kif deskritta fi (17). Minħabba li d-diversi metodi jistgħu ma jagħtux valuri identiċi, huwa importanti li jingħataw dettalji tal-metodu użat. Meta jkun possibbli, jiġifieri jekk ikun disponibbli tessut suffiċjenti tad-dud, l-analiżi tal-lipidi għandha idealment issir fuq l-istess kampjun jew estratt bħal dak użat għal analiżi tal-kimika għall-ittestjar, minħabba li l-lipidi sikwit ikollhom jitneħħew mill-estratt qabel ma jkunu jistgħu jiġu analizzati kromatografikament (49). Alternattivament, jistgħu jintużaw annimali ta' kontroll biex jitkejjel il-kontenut ta' lipidi, li mbagħad ikunu jistgħu jintużaw biex jinnormalizzaw valuri tal-BAF. Dan l-aħħar approċċ inaqqas il-kontaminazzjoni ta' tagħmir mal-kimika għall-ittestjar.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

54. Il-kurva ta' assorbiment tal-kimika għall-ittestjar tinkiseb billi l-konċentrazzjoni tagħha tiġi mmarkata fi/fuq id-dud matul il-fażi ta' assorbiment mal-ħin fuq skali aritmetiċi. Meta l-kurva tkun laħqet livell kostanti jew stat regolari (ara d-definizzjonijiet fl-Appendiċi 1), il-fattur BAFss ta' akkumulazzjoni bijoloġika tal-istat regolari jkun ikkalkulat skont:

$$\frac{C_a \text{ fi stat regolari jew fi tmiem ta' fażi ta' assorbiment (medja)}}{C_s \text{ fi stat regolari jew fi tmiem ta' fażi ta' assorbiment (medja)}}$$

C_a huwa l-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fl-organiżmu tat-test

C_s huwa l-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fil-ħamrija

55. Meta ma jintlaħaq ebda stat regolari, il-BAFK, ibbażat fuq il-kostanti ta' rati, għandu jkun ikkalkulat minflok il-BAFss, kif deskritt hawn taħt:

— Iddetermina l-fattur ta' akkumulazzjoni (BAFK) bħala l-proporzjon k_s/k_e.

— Rati ta' assorbiment u eliminazzjoni preferibbilment ikunu kkalkulati simultanjament (ara l-Ekwazzjoni 11 fl-Appendiċi 2)

— Il-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) is-soltu jkun iddeterminat mill-kurva ta' eliminazzjoni (jiġifieri grafika tal-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test tad-dud matul il-fażi ta' eliminazzjoni). Il-kostant tar-rata ta' assorbiment k_s mbagħad ikun ikkalkulat skont ke u valur ta' C_a li jidderiva mill-kurva ta' assorbiment – ara l-Appendiċi 2 għal deskrizzjoni ta' dawn il-metodi. Il-metodu ppreferut biex jinkiseb BAF_K u l-kostanti tar-rati, k_s, u k_e, huwa li jintużaw metodi mhux lineari ta' stima ta' parametri fuq kompjuter. Jekk l-eliminazzjoni ovvjament ma tkunx tal-ewwel ordni, f'dak il-każ għandhom jintużaw mudelli aktar kumplessi.

Rapport tat-test

56. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

— Kull informazzjoni disponibbli dwar tossiċità akuta jew fit-tul (eż. EC_x, LC_x „ NOEC) tal-kimika għall-ittestjar għal oligochaetes li jgħixu fil-ħamrija;

— purezza, natura fiżika u proprjetajiet fiżikokimiċi, eż. log K_{ow}, solubilità tal-ilma;

— dejta ta' identifikazzjoni ta' kimiċi; sors tal-oġġett tat-test, identità u konċentrazzjoni ta' kull solvent użat;

— jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radju, il-pożizzjoni preċiża tal-atomi bit-tikketta, ir-radjuattività speċifika u l-purezza radjukimika.

Speċi tat-test:

— isem xjentifiku, razza, sors, kull trattament minn qabel, akklimatazzjoni, età, daqs-firxa, eċċ..

▼M4

Kondizzjonijiet tat-test:

— proċedura tat-test użat;

— tip u karatteristiċi ta' lluminazzjoni użati u fotoperjodu/i;

— disinn tat-test (eż. għadd u daqs ta' reċipjenti tat-test, massa ta' ħamrija u għoli ta' saff ta' ħamrija, għadd ta' replikati, għadd ta' dud għal kull replikat, għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test, durata ta' fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni, frekwenza ta' teħid ta' kampjuni);

— motiv għall-għażla tal-materjal tar-reċipjent tat-test;

— metodu ta' tħejjija u applikazzjoni ta' oġġett tat-test, kif ukoll raġunijiet għall-għażla ta' metodu speċifiku;

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test, u l-metodu li bih dawn il-valuri nkisbu;

— sors tal-kostitwenti tal-ħamrija artifiċjali jew – jekk jintużaw midja naturali – l-oriġni tal-ħamrija, deskrizzjoni ta' kull trattament minn qabel, riżultati tal-kontrolli (sopravivenza, żvilupp ta' bijomassa, riproduzzjoni), karatteristiċi tal-ħamrija (pH, kontenut totali ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partiċelli (perċentwali ta' ramel, fajd u tafal)), WHC_{max}, kontenut ta' ilma f'perċentwali fil-bidu u fit-tmiem tat-test, u kejlijiet oħra magħmulin);

— informazzjoni dettaljata dwar it-trattament ta' kampjuni tal-ħamrija u ta' dud, inklużi dettalji dwar tħejjija, ħżin, proċeduri ta' fortifikazzjoni, estrazzjoni u proċeduri analitiċi (u preċiżjoni) għall-oġġett tat-test f'dud u fil-ħamrija, u kontenut ta' lipidi (jekk imkejjel) u rkupri tal-oġġett tat-test.

Riżultati:

— mortalità tad-dud tal-kontroll u d-dud f'kull reċipjent tat-test u kull mġiba mhux normali osservata (eż., evitar ta' ħamrija, nuqqas ta' riproduzzjoni f'test ta' akkumulazzjoni bijoloġika b'enchytraeids);

— il-proporzjon ta' piż fin-niexef għal piż fl-imxarrab tal-ħamrija u l-organiżmi tat-test (utli għal normalizzazzjoni);

— il-piżijiet fl-imxarrab tad-dud waqt li jkunu qed jittieħdu kampjuni; għal ħniex, il-piżijiet fl-imxarrab fil-bidu tat-test u f'kull żmien ta' teħid ta' kampjuni qabel u wara tindif ta' msaren;

— il-kontenut ta' lipidi tal-organiżmi tat-test (jekk determinati);

— kurvi, li juru l-kinetika ta' assorbiment u eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fid-dud, u ż-żmien għal stat regolari;

— C_a u C_s (b'devjazzjoni u firxa standard, jekk ikun jixraq) għaż-żmijiet kollha ta' teħid ta' kampjuni (C_a espressa f'g kg^{-1} piż fl-imxarrab u fin-niexef tal-korp kollu, C_s espressa f'g kg^{-1} piż fl-imxarrab u fin-niexef ta' ħamrija). Jekk ikun meħtieġ fattur ta' akkumulazzjoni bijota-ħamrija (BSAF) (eż. għal tqabbil ta' riżultati minn żewġ testijiet jew aktar magħmulin fuq annimali ta' kontenut differenti ta' lipidi), C_a tista' addizzjonalment tkun espressa bħala g kg^{-1} ta' kontenut ta' lipidi tal-organiżmu, u C_s tista' tkun espressa bħala g kg^{-1} ta' karbonju organiku (OC) tal-ħamrija;

— BAF (espress f'kg ta' ħamrija kg^{-1} ta' dud), kostant k_s tar-rata ta' assorbiment ta' ħamrija (espress f'g ta' kg^{-1} ta' ħamrija ta' jum^{-1} ta' dud), u kostant ke tar-rata ta' eliminazzjoni k_e (espressa f'jum^{-1}); BSAF (espress f'kg ta' ħamrija ta' OC kg^{-1} kontenut ta' lipidi ta' dud) jistgħu jkunu rrapportati addizzjonalment;

▼M4

— jekk imkejjel: perċentwali ta' kimika prinċipali, metaboliti, u residwi magħqudin (jiġifieri l-perċentwali ta' kimika għall-ittestjar li ma tistax tkun estratta b'metodi komuni ta' estrazzjoni) misjuba fil-ħamrija u annimali tat-test;

— metodi użati għall-analiżi ta' statistika ta' dejta.

Evalwazzjoni ta' riżultati:

— konformità tar-riżultati mal-kriterji ta' validità kif elenkati fil-paragrafu 17;

— riżultati mhux mistennija jew mhux tas-soltu, eż. eliminazzjoni mhux kompleta tal-kimika għall-ittestjar mill-annimali tat-test.

LETTERATURA:

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1 000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tal-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għall-kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Jista' jitniżżel minn: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Kanada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità għal Ħniex

(49) Il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness: Konċentrazzjoni bijoloġika: flow-through fish test.

(50) Il-Kapitolu C.21 ta' dan l-Anness: Mikroorganiżmi tal-Ħamrija: Test ta' Trasformazzjoni ta' Nitroġenu.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.

▼M4

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkumulazzjoni bijoloġika hija ż-żieda f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fi jew fuq organiżmu relattiv għall-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-midjum tal-madwar. Riżultati ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn proċessi kemm ta' konċentrazzjoni bijoloġika kif ukoll ta' tkabbir bijoloġiku (ara hawn taħt).

Konċentrazzjoni bijoloġika hija ż-żieda f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fi jew fuq organiżmu, li tirriżulta mill-assorbiment tal-kimika esklussivament mill-midjum tal-madwar (jiġifieri permezz tal-wiċċ tal-ġisem u ħamrija li tkun iddaħħlet), relattiv għall-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-midjum tal-madwar.

Tkabbir bijoloġiku huwa ż-żieda f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fi jew fuq organiżmu, li jirriżulta l-aktar minn assorbiment minn ikel jew priża kontaminati, relattiv għall-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-ikel jew fil-priża. Tkabbir bijoloġiku jista' jwassal għal trasferiment jew akkumulazzjoni tal-oġġett tat-test f'siti elettroniċi tal-ikel.

L-**eliminazzjoni** ta' kimika għall-ittestjar hija t-telf ta' din il-kimika mit-tessut tal-organiżmu tat-test bi proċessi attivi jew passivi li jseħħu indipendentement minn jekk ikun hemm jew ma jkunx hemm l-oġġett tat-test fil-midjum tal-madwar.

Il-**fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika** (BAF) f'kull żmien matul il-fażi ta' assorbiment ta' dan it-test ta' akkumulazzjoni bijoloġika huwa l-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fi/fuq l-organiżmu tat-test (C_a fi $g \cdot kg^{-1}$ piż fin-niexef tad-dudu) diviż bil-konċentrazzjoni tal-kimika fil-midjum tal-madwar (C_s bħala $g \cdot kg^{-1}$ tal-piż fin-niexef tal-ħamrija); il-BAF għandu l-unitajiet ta' kg ħamrija$\cdot kg^{-1}$ dudu.

Il-**fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika** ta' stat regolari (BAF_{ss}) huwa l-BAF fi stat regolari u ma jitbiddilx b'mod sinifikanti tul perjodu prolongat ta' żmien, bil-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-midjum tal-madwar (C_s bħala $g.kg^{-1}$ tal-piż fin-niexef tal-ħamrija) tkun kostanti matul dan il-perjodu ta' żmien.

Fatturi ta' akkumulazzjoni bijoloġika kkalkulati direttament mill-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' assorbiment ta' ħamrija u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_s u k_e, ara hawn taħt) jissejħu fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika (BAF_K).

Il-**fattur ta' akkumulazzjoni bijota-ħamrija** (BSAF) huwa l-konċentrazzjoni normalizzata b'lipidi tal-kimika għall-ittestjar fi/fuq l-organiżmu tat-test diviża bil-konċentrazzjoni organika normalizzata bil-karbonju tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija fi stat regolari. C_a huwa mbagħad espress bħala kontenut ta' lipidi $g \cdot kg^{-1}$ tal-organiżmu, u C_s bħala konenut organiku $g \cdot kg^{-1}$ tal-ħamrija; il-BSAF għandu l-unitajiet ta' lipidi kg $OC \cdot kg^{-1}$.

Livell kostanti jew **stat regolari** huwa ddefinit bħala l-ekwilibriju bejn il-proċessi ta' assorbiment u ta' eliminazzjoni li jseħħ fl-istess waqt matul il-fażi ta' espożizzjoni. L-istat regolari jintlaħaq fil-grafika ta' BAF mal-ħin meta l-kurva tiġi parallela mal-assi tal-ħin u tliet analiżi ta' BAF wara xulxin magħmulin fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' mill-anqas jumejn ikunu qrib 20 % waħda mill-oħra, u ma jkunx hemm differenzi sinifikanti ta' statistika fost it-tliet perjodi ta' teħid ta' kampjuni. Għal kimiċi għall-ittestjar li jkunu kkunsmati bil-mod, intervalli aktar adatti jkunu ta' sebat ijiem (49).

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni organika karbonju-ilma** (K_{oc}) huwa l-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' kimika fi/fuq il-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-kimika fl-ilma f'ekwilibriju.

Il-**koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma** (K_{ow}) huwa l-proporzjon ta' solubilità ta' kimika f'n-ottanol u f'ilma f'ekwilibriju, espress ukoll xi drabi bħala P_{ow}. Il-logaritmu ta' K_{ow} (log K_{ow}) jintuża bħala indikazzjoni tal-potenzjal ta' kimika għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organiżmi akwatiċi.

▼**M4**

Il-**fażi ta' assorbiment jew ta' espożizzjoni** hija l-ħin li matulu l-organiżmi tat-test ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar.

Il-**kostant tar-rata ta' assorbiment ta' ħamrija** (k_s) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' żieda fil-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fi/fuq l-organiżmu tat-test li jirriżulta minn assorbiment mill-fażi tal-ħamrija. k_s huwa espress f'g ħamrija kg^{-1} ta' dudu d^{-1}.

Il-**fażi ta' eliminazzjoni** hija l-ħin, wara t-trasferiment tal-organiżmi tat-test minn midjum kontaminat għal midjum ħieles mill-oġġett tat-test, li matulha tkun studjata l-eliminazzjoni (jew it-telf nett) tal-kimika mill-organiżmi tat-test.

Il-**kostant tar-rata ta' eliminazzjoni** (k_e) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fi/fuq l-organiżmu tat-test, wara t-trasferiment tal-organiżmi tat-test minn midjum li jkun fih l-oġġett tat-test għal midjum ħieles minn kimiċi; k_e hija espressa $f'd^{-1}$.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 2

Kalkulazzjoni ta' parametri ta' assorbiment u eliminazzjoni

Il-punt ta' tmiem ewlieni ta' test ta' akkumulazzjoni bijoloġika huwa l-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika, BAF. Il-BAF imkejjel jista' jiġi kkalkulat bid-diviżjoni tal-konċentrazzjoni fl-organiżmu tat-test, C_a, bil-konċentrazzjoni fil-ħamrija, C_s, fi stat regolari. Jekk l-istat regolari ma jintlaħaqx matul il-fażi ta' espożizzjoni, il-BAF_K ikun ikkalkulat mill-kostanti ta' rati minflok minn BAFss. Iżda għandu jkun innotat jekk il-BAF ikunx ibbażat fuq konċentrazzjonijiet ta' stati uniformi jew le.

Il-mezzi tas-soltu għall-kisba tal-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika (BAF_K), il-kostant tar-rata ta' assorbiment ta' ħamrija (k_s) u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) huwa li jintużaw metodi ta' stima ta' parametri mhux lineari b'kompjuter, eż., ibbażati fuq il-mudelli deskritti f'(68). Mogħti sett ta' dejta ta' konċentrazzjoni ta' sekwenza ta' ħin u l-ekwazzjonijiet mudell:

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

jew

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 2]}$$

fejn:

C_a = konċentrazzjoni ta' kimika f'dud [g kg-1 piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_s = kostant tar-rata ta' assorbiment f'tessut [g ħamrija kg-1 ta' dudu d-1]

C_s = konċentrazzjoni ta' kimika fil-ħamrija [g kg-1 ta' piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_e = kostant tar-rata ta' eliminazzjoni [d-1]

t_c = ħin fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment,

dawn il-programmi tal-kompjuter jikkalkulaw valuri għal BAF_K, k_s u k_e.

Meta l-konċentrazzjoni ta' bażi fid-dud mhux espost, eż. fil-jum 0 tkun differenti b'mod sinifikanti minn żero (dan jista' pereżempju jkun il-każ għal metalli), din il-konċentrazzjoni ta' bażi ($C_{a,0}$) għandha tkun inkluża f'dawn l-ekwazzjonijiet, biex isiru jaqraw:

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

u

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

F'każijiet fejn ikun osservat tnaqqis sinifikanti tal-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija tul il-ħin matul il-fażi ta' assorbiment, jistgħu pereżempju jintużaw il-mudelli li ġejjin (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[ekwazzjoni 5]}$$

▼M4

fejn:

C_s = konċentrazzjoni ta' kimika fil-ħamrija [g kg-1 piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_0 = kostant ta' rata ta' degradazzjoni fil-ħamrija [d-1]

C_0 = konċentrazzjoni inizjali tal-kimika fil-ħamrija [g kg-1 ta' piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

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

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

fejn:

C_a = konċentrazzjoni ta' kimika f'dud [g kg-1 piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_s = kostant tar-rata ta' assorbiment f'tessut [g ħamrija kg-1 ta' dudu d-1]

k_0 = kostant ta' rata ta' degradazzjoni fil-ħamrija [d-1]

k_e = kostant tar-rata ta' eliminazzjoni [d-1]

t_c = ħin fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment,

Meta jintlaħaq stat regolari matul il-fażi ta' assorbiment (jiġifieri $t = \infty$), ekwazzjoni 1

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

tista' titnaqqas għal:

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

jew

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[ekwazzjoni 8]}$$

F'liema każ k_s/k_e x C_s ikun approċċ għall-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fit-tessut tad-dud fi stat regolari ($C_{a,ss}$).

Il-fattur ta' akkumulazzjoni bijota-ħamrija (BSAF) jista' jkun ikkalkulat kif ġej:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[ekwazzjoni 9]}$$

fejn f_{oc} huwa l-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' ħamrija, u f_{lip} huwa l-frazzjoni ta' lipidi ta' dud, it-tnejn preferibbilment iddeterminati minn kampjuni meħudin mit-test, u bbażati jew fuq piż fin-niexef jew fuq piż fl-imxarrab, rispettivament.

Il-kinetika ta' eliminazzjoni tista' tkun immudellata bl-użu tad-dejta mill-fażi ta' eliminazzjoni u bl-applikazzjoni tal-ekwazzjoni mudell u metodu ta' stima ta' parametri mhux lineari b'bażi tal-kompjuter li ġejjin. Jekk il-punti tad-dejta mmarkati mal-ħin jindikaw tnaqqis esponenzjali kostanti tal-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fl-annimali, ikun jista' jintuża mudell ta' kompartiment wieħed (ekwazzjoni 9) biex jiddeskrivi l-perkors tal-ħin ta' eliminazzjoni.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[ekwazzjoni 10]}$$

▼**M4**

Proċessi ta' eliminazzjoni xi drabi jidhru li jkunu ta' żewġ fażijiet, li juru tnaqqis mgħaġġel ta' C_a matul il-fażijiet bikrija, li jinbidel għal telf aktar bil-mod ta' oġġetti tat-test fil-fażijiet ta' wara tal-eliminazzjoni, eż. (27) (68). Iż-żewġ fażijiet jistgħu jkunu interpretati billi wieħed jassumi li jkun hemm żewġ kompartimenti differenti fl-organiżmu, li minuu l-oġġett tat-test jintilef b'veloċitajiet differenti. F'dawn il-każijiet, għandha tkun studjata letteraura speċifika, eż. (38) (39) (40) (78).

Bl-użu tal-ekwazzjonijiet mudelli ta' hawn fuq, il-parametri kinetiċi (k_s u k_e) jistgħu wkoll ikunu kkalkulati b'operazzjoni waħda bl-applikazzjoni fl-istess waqt tal-mudell ta' kinetika tal-ewwel grad għad-dejta kollha mill-fażi kemm ta' assorbiment, kif ukoll ta' eliminazzjoni. Għal deskrizzjoni ta' metodu li jista' jippermetti kalkulazzjoni konġunta bħal din ta' kostanti ta' rata ta' assorbiment u eliminazzjoni, jistgħu jkunu kkonsultati r-referenzi, (181), (213) u (210).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[ekwazzjoni 11]}$$

Nota: Meta parametri ta' assorbiment u eliminazzjoni jkunu stmati fl-istess waqt mid-dejta konġunta ta' assorbiment u eliminazzjoni, "m" kif tidher fl-ekwazzjoni 11 hija deskrittriċi li tħalli lill-programm tal-kompjuter jassenja t-termini sekondarji tal-ekwazzjoni lis-settijiet ta' dejta tal-fażi rispettiva u li jagħmel l-evalwazzjoni b'mod korrett (m = 1 għal fażi ta' assorbiment; m = 2 għal fażi ta' eliminazzjoni).

Madankollu, dawn l-ekwazzjonijiet mudelli għandhom jintużaw b'kawtela, l-aktar meta bidliet fid-disponibbiltà bijoloġika tal-kimika għall-ittestjar jew fid-degradazzjoni (bijoloġika) iseħħu matul it-test (ara eż. (79)).

▼M4

Appendiċi 3

EŻEMPJI TA' SKEDI GĦAL TESTIJIET TA' AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' ĦAMRIJA

Test tal-ħniex

(a) Fażi ta' espożizzjoni bi 8 dati ta' teħid ta' kampjuni użati għal kalkulazzjoni ta' kinetika

Jum	Attività
– 6	Kondizzjonament tal-ħamrja mħejjija għal 48 siegħa;
– 4	Il-frazzjoni tal-ħamrija li tkun iffortifikata mas-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar; evaporizzazzjoni ta' kull solvent; taħlit tal-kostitwenti tal-ħamrija; distribuzzjoni tal-ħamrija mar-reċipjenti tat-test; ekwilibrazzjoni f'kondizzjonijiet tat-test għal 4 jiem (3 ġimgħat għal ħamrija fortifikata bil-metall);
– 3 sa – 1	Separazzjoni tal-organiżmi tat-test mill-kultura għal akklimatazzjoni; tħejjija u rtib tal-kostitwenti tal-ħamrija;
0	Kejl tat-temperatura, u l-pH tal-ħamrija; tneħħija ta' kampjuni tal-ħamrija minn reċipjenti ttrattati u kontroll ta' solventi għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar; żieda ta' razzjon ta' ikel; użin u distribuzzjoni każwali tad-dud fir-reċipjenti tal-ħniex; żamma ta' kampjuni sekondarji suffiċjenti ta' dud għal determinazzjoni ta' valuri analitiċi bażiċi, piż fl-imxarrab u fin-niexef, u kontenut ta' lipidi; użin tar-reċipjenti kollha tat-test għall-kontroll tal-irtuba tal-ħamrija; kontroll tal-provvista tal-arja, jekk tkun magħluqa tintuża s-sistema tat-test;
1	Kontroll tal-provvista tal-arja, reġistrazzjoni ta' x'jagħmlu d-dud u t-temperatura; teħid ta' kampjuni tal-ħamrija u tad-dud għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni ta' oġġett tat-test;
2	L-istess bħal jum 1;
3	Kontroll tal-provvista tal-arja, x'jagħmlu d-dud u t-temperatura;
4	L-istess bħal jum 1;
5 - 6	L-istess bħal jum 3;
7	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
8 - 9	L-istess bħal jum 3;
10	L-istess bħal jum 1;
11 - 13	L-istess bħal jum 3;
14	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
15 - 16	L-istess bħal jum 3;
17	L-istess bħal jum 1;
18 - 20	L-istess bħal jum 3;

▼**M4**

Jum	Attività
21	L-istess bħal jum 1; kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test; tmiem ta' fażi ta' espożizzjoni; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal ġo reċipjenti li jkun fihom ħamrija nadifa għal fażi ta' eliminazzjoni (ebda tindif ta' msaren); teħid ta' kampjuni ta' ħamrija u ta' dud minn kontrolli ta' solventi.
	Attivitajiet ta' espożizzjoni minn qabel (fażi ta' ekwilibrazzjoni) għandhom ikunu skedati, meqjusin il-proprjetajiet tal-kimika għall-ittestjar.
	Attivitajiet deskritti għal jum 3 għandhom isiru kuljum (mill-anqas fil-jiem tax-xogħol).

(b) Fażi ta' eliminazzjoni

Jum	Attività
– 6	Tħejjija u rtib tal-kostitwenti tal-ħamrija; kondizzjonament tal-ħamrja mħejjija għal 48 siegħa;
– 4	Taħlit tal-kostitwenti tal-ħamrija; distribuzzjoni tal-ħamrija mar-reċipjenti tat-test; inkubazzjoni f'kondizzjonijiet tat-test għal 4 ijiem;
0 (tmiem ta' fażi ta' assorbiment)	Kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; użin u distribuzzjoni każwali tad-dud fir-reċipjenti tal-ħniex; żieda ta' razzjon ta' ikel; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal ġo reċipjenti li jkun fihom ħamrija nadifa; teħid ta' kampjuni tal-ħamrija u tad-dud wara 4 – 6 sigħat għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
1	Kontroll tal-provvista tal-arja, reġistrazzjoni ta' x'jagħmlu d-dud u t-temperatura; teħid ta' kampjuni tal-ħamrija u tad-dud għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
2	L-istess bħal jum 1;
3	Kontroll tal-provvista tal-arja, x'jagħmlu d-dud u t-temperatura;
4	L-istess bħal jum 1;
5 - 6	L-istess bħal jum 3;
7	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
8 - 9	L-istess bħal jum 3;
10	L-istess bħal jum 1;
11 - 13	L-istess bħal jum 3;
14	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
15 - 16	L-istess bħal jum 3;
17	L-istess bħal jum 1;

▼**M4**

Jum	Attività
18 - 20	L-istess bħal jum 3;
21	L-istess bħal jum 1; kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test; teħid ta' kampjuni ta' ħamrija u ta' dud minn kontrolli ta' solventi.
	Tħejjija tal-ħamrija qabel ma tinbeda fażi ta' eliminazzjoni għandha ssir bl-istess mod bħal qabel il-fażi ta' espożizzjoni.
	Attivitajiet deskritti għal jum 3 għandhom isiru kuljum (mill-anqas fil-jiem tax-xogħol).

Test ta' enchytraeid

(a) Fażi ta' assorbiment bi 8 dati ta' teħid ta' kampjuni użati għal kalkulazzjoni ta' kinetika

Jum	Attività
– 6	Kondizzjonament tal-ħamrja mħejjija għal 48 siegħa;
– 4	Il-frazzjoni tal-ħamrija li tkun iffortifikata mas-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar; evaporizzazzjoni ta' kull solvent; taħlit tal-kostitwenti tal-ħamrija; distribuzzjoni tal-ħamrija mar-reċipjenti tat-test; ekwilibrazzjoni f'kondizzjonijiet tat-test għal 4 ijiem (3 ġimgħat għal ħamrija fortifikata bil-metall);
– 3 sa – 1	Separazzjoni tal-organiżmi tat-test mill-kultura għal akklimatazzjoni; tħejjija u rtib tal-kostitwenti tal-ħamrija;
0	Kejl tat-temperatura, u l-pH tal-ħamrija; tneħħija ta' kampjuni tal-ħamrija minn reċipjenti ttrattati u kontroll ta' solventi għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar; żieda ta' razzjon ta' ikel għall-ħamrija; użin u distribuzzjoni każwali tad-dud fir-reċipjenti tal-ħniex; żamma ta' kampjuni sekondarji suffiċjenti ta' dud għal determinazzjoni ta' valuri analitiċi bażiċi, piż fl-imxarrab u fin-niexef, u kontenut ta' lipidi; użin tar-reċipjenti kollha tat-test għall-kontroll tal-irtuba tal-ħamrija; kontroll tal-provvista tal-arja, jekk tkun magħluqa tintuża s-sistema tat-test;
1	Kontroll tal-provvista tal-arja, reġistrazzjoni ta' x'jagħmlu d-dud u t-temperatura; teħid ta' kampjuni tal-ħamrija u tad-dud għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni ta' oġġett tat-test;
2	L-istess bħal jum 1;
3	Kontroll tal-provvista tal-arja, x'jagħmlu d-dud u t-temperatura;
4	L-istess bħal jum 1;
5 - 6	L-istess bħal jum 3;
7	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel għall-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
9	L-istess bħal jum 1;
10	L-istess bħal jum 3;

▼**M4**

Jum	Attività
11	L-istess bħal jum 1;
12 - 13	L-istess bħal jum 3;
14	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel għall-ħamrija; kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test; tmiem ta' fażi ta' espożizzjoni; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal żo reċipjenti li jkun fihom ħamrija nadifa għal fażi ta' eliminazzjoni (ebda tindif ta' msaren); teħid ta' kampjuni ta' ħamrija u ta' dud minn kontrolli ta' solventi.
	Attivitajiet ta' espożizzjoni minn qabel (fażi ta' ekwilibrazzjoni) għandhom ikunu skedati, meqjusin il-proprjetajiet tal-kimika għall-ittestjar.
	Attivitajiet deskritti għal jum 3 għandhom isiru kuljum (mill-anqas fil-jiem tax-xogħol).

▼M4

Appendiċi 4

Ħamrija artifiċjali – rakkomandazzjonijiet dwar tħejjija u ħżin

Minħabba li ħamrija naturali minn sors partikolari tista' ma tkunx disponibbli s-sena kollha, u organiżmi indiġeni, kif ukoll il-preżenza ta' mikrosustanzi li jniġġsu jistgħu jinfluwenzaw it-test, huwa rrakkomandat substrat artifiċjali, il-ħamrija artifiċjali skont il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità għal Ħniex (48) biex jintuża f'dan it-test. Diversi speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu ħajjin, jikbru u jirriproduċu f'din il-ħamrija, u hija pprovduta standardizzazzjoni massima, kif ukoll komparabbiltà f'laboratorji u bejniethom ta' kondizzjonijiet tat-test u ta' kultura.

Ħamrija kostitwenti:

Pit:	10 %	Pit Sphagnum, skont skont il-Linja Gwida 207 tal-OECD (48);
Ramel tal-quartz:	70 %	Ramel tal-quartz industrijali (mnixxef bl-arja); daqs ta' ramla: aktar minn 50 % tal-partiċelli għandhom ikunu fil-firxa ta' 50-200 μm, iżda l-partiċelli kollha għandhom ikunu ≤ 2 mm;
Tafal tal-kawlina:	20 %	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %;
Karbonat tal-kalċju:	≤ 1 %	$CaCO_3$,pulverizzat, kemikament pur

B'mod fakultattiv, il-kontenut ta' karbonju organiku tal-ħamrija artifiċjali jista' jitnaqqas, eż. billi jitnaqqas il-kontenut tal-pit għal 4-5 % ta' ħamrija xotta u jiżdied il-kontenut ta' ramel b'dan il-mod. Bi tnaqqis bħal dan f'kontenut ta' karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' sorbiment ta' kimika għall-ittestjar mill-ħamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tal-kimika għall-ittestjar għad-dud tista' tiżdied (74). Intwera li *Enchytraeus albidus u Eisenia fetida* jistgħu jkunu jaqblu mal-kriterji ta' validità dwar riproduzzjoni meta ttestjati f'ħamrija ta' għelieqi b'kontenut baxx ta' karbonju organiku, eż. 2,7 % (33), (201), u mill-esperjenza dan jista' jinkiseb f'ħamrija artifiċjali b'5 % pit.

Tħejjija

Il-kostitwenti nixfin tal-ħamrija jitħalltu sewwa (eż. f'mikser ta' skala kbira f'laboratorju). Dan għandu jsir xi ġimgħa qabel ma jinbeda t-test. Il-kostitwenti nixfin imħalltin tal-ħamrija għandhom jitrattbu b'ilma dejonizzat mill-anqas 48 siegħa qabel l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test biex l-aċidità tiġi ekwilibrata/stabbilizzata. Għad-determinazzjoni ta' pH tintuża taħlita ta' ħamrija u 1 M KCl fi proporzjon ta' 1:5. Jekk il-valur pH ma jkunx fil-firxa meħtieġa (6,0 ± 0,5), jiżdied ammont suffiċjenti ta' $CaCO_3$ fil-ħamrija, jew jitħejja lott ġdid ta' ħamrija.

Il-kapaċità massima għal żamma ta' ilma (WHC) tal-ħamrija artifiċjali tiġi ddeterminata skont ISO 11268-2 (35). Mill-anqas jumejn qabel ma jinbeda t-test, il-ħamrija artifiċjali xotta titrattab billi jiżdied ilma biżżejjed dejonizzat jew rikostitwit biex jinkiseb bejn wieħed u ieħor nofs il-kontenut finali ta' ilma. Il-kontenut finali ta' ilma għandu jkun minn 40 % sa 60 % tad-WHC massima. Fil-bidu tat-test, il-ħamrija mrattba minn qabel tinqasam f'tant lottijiet daqs kemm ikun l-għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test u kontrolli użati għat-test, u l-kontenut ta' rtuba jkun aġġustat għal 40 – 60 % tad-WHC_{max} billi tintuża s-soluzzjoni tal-oġġett tat-test u/jew billi jiżdied ilma dejonizzat jew rikostitwit. Il-kontenut ta' rtuba jkun iddeterminat fil-bidu u fit-tmiem tat-test (f'105 °C). Huwa għandu jkun l-aħjar għall-ħtiġijiet tal-ispeċi (il-kontenut ta' rtuba jista' jkun iċċekkjat kif ġej: meta l-ħamrija tingħafas bil-mod fl-idejn, għandhom joħorġu qtar żgħir bejn is-swaba).

▼**M4**

Ħżin

Il-kostitwenti nixfin tal-ħamrija artifiċjali jistgħu jinħażnu f'temperatura ambjentali sakemm jibdew jintużaw. Il-ħamrija mħejjija u mrattba minn qabel tista' tinħażen f'post frisk sa tliet ijiem qabel ma tkun iffortifikata; wieħed għandu joqgħod attent li jara li l-evaporazzjoni tal-ilma tkun mill-anqas. Ħamrija fortifikata bl-oġġett tat-test għandha tkun użata minnufih sakemm ma jkunx hemm informazzjoni li turi li l-ħamrija partikolari tkun tista' tinħażen mingħajr ma jintlaqtu t-tossiċità u d-disponibbiltà bijoloġika tal-oġġett tat-test. Kampjuni ta' ħamrija fortifikata jistgħu mbagħad jinħażnu skont il-kondizzjonijiet irrakkomandati għall-oġġett tat-test partikolari sakemm issir analiżi.

▼M4

Appendiċi 5

Speċi ta' oligochaetes terrestri rrakkomandat għall-ittestjar ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn ħamrija

Hniex

L-ispeċi tat-test irrakkomandata hija *Eisenia fetida* (Savigny 1826), li hija tal-familja Lumbricidae. Mill-1972 'il hawn tinqasam f'żewġ subspeċi (*Eisenia fetida u Eisenia andrei* (10)). Skont Jaenike (36), huma mhumiex speċi veri, separati. *Eisenia fetida* tingħaraf malajr mill-faxex ta' lewn isfar jgħajjat inter-segmentali tagħha, filwaqt li *Eisenia andrei* hija ta' lewn aħmar uniformi, skur. Aktarx joriġinaw mir-reġjun tal-Baħar l-Iswed, illum huma mifruxin mad-dinja kollha, l-aktar f'habitats immodifikati antropoġenikament bħal munzelli ta' kompost. It-tnejn jistgħu jintużaw għal testijiet ekotossikoloġiċi, kif ukoll ta' akkumulazzjoni bijoloġika.

Eisenia fetida u Eisenia andrei jistgħu jinkisbu kummerċjalment, pereżempju bħala lixka għall-ħut. Mqabbla ma' dud oħra tal-ħamrija ta' lumbriċidi, iċ-ċiklu ta' ħajjithom huwa qasir u jimmaturaw f'madwar 2 – 3 xhur (f'temperatura ambjentali). L-aħjar temperatura għalihom hija bejn wieħed u ieħor 20 – 24 C. Jippreferu substrati relattivament niedja b'pH kważi newtrali u b'kontenut kbir ta' materjal organiku. Minħabba li dawn l-ispeċijiet intużaw ħafna f'testijiet ekotossikoloġiċi standardizzati għal madwar 25 sena, il-mod ta' kultura tagħhom huwa stabbilit sewwa (48) (77).

Iż-żewġ speċi jistgħu jitrabbew f'firxa wiesgħa ta' skart ta' annimali. Il-midjum ta' trobbija rrakkomandat minn ISO (35) huwa ta' taħlita 50:50 ta' demel taż-żiemel jew tal-baqar u pit. Il-midjum għandu jkollu valur ta' pH ta' madwar 6 sa 7 (irregolat bil-karbonat tal-kalċju), konduttività jonika baxxa (anqas minn 6 mS/cm jew anqas minn 0,5 % ta' konċentrazzjoni ta' melħ) u m'għandux ikun ikkontaminat b'mod eċċessiv b'ammonja jew b'awrina tal-annimali. Tista' tintuża wkoll ħamrija kummerċjali għal xogħol tal-ġnien ħielsa minn addittivi, jew ħamrija artifiċjali skont l-OECD (48), jew taħlita 50:50 tat-tnejn. Is-substrat għandu jkun niedi iżda mhux imxarrab ħafna. Kaxex għat-trobbija ta' volum ta' minn 10 litri sa 50 litru jkunu tajbin.

Biex jinkiseb dud ta' età u massa standard, l-aħjar hu li l-kultura tinbeda b'fosdqiet. Għalhekk, dud adult jiżdied f'kaxxa għat-trobbija li jkun fiha substrat frisk biex jipproduċi fosdqiet. L-esperjenza prattika wriet li kwantità densa ta' bejn wieħed u ieħor 100 dudu adult għal kull kg substrat (piż fl-imxarrab) twassal għal rati ta' riproduzzjoni tajbin. Wara 28 jum id-dud adult jitneħħa. Il-ħniex li jfaqqsu mill-fosdqiet jintużaw għall-ittestjar meta jkunu maturi wara mill-anqas xahrejn (2) iżda anqas minn 12-il xahar.

Dud tal-ispeċi deskritta hawn fuq jista' jitqies li jkun f'saħħtu jekk jiċċaqlaq fis-substrat, ma jippruvax jitlaq mis-substrat u jirriproduċi kontinwament. Ċaqliq bil-mod ħafna jew tarf tal-warrani isfar (fil-każ ta' *Eisenia fetida*) jindikaw substrat eżawrit. F'dan il-każ, huwa rrakkomandat substrat ġdid u/jew għadd iżgħar ta' annimali għal kull kaxxa.

Referenzi magħżula addizzjonali

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchytraeids

L-ispeċi tat-test irrakkomandata hija *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (ħanex abjad). *Enchytraeus albidus* huwa wieħed mill-akbar (sa 15-il mm) tal-ispeċi Enchytraeidae tal-familja annelid oligochaete, u jinsab mifrux mad-dinja kollha, eż. (8). *Enchytraeus albidus* jinsab f'habitats marini, limniċi u terrestri, l-aktar f'materja organika fi stat ta' degradazzjoni (alka, kompost) u rarament f'mergħat (42). Din it-tolleranza ekoloġika wiesgħa u xi varjazzjonijiet morfoloġiċi jindikaw li jista' jkun hemm razez differenti ta' din l-ispeċi.

Enchytraeus albidus jista' jinkiseb kummerċjalment, u jinbiegħ bħala ikel għall-ħut. Wieħed għandu jara jekk il-kultura tiegħu tkunx ikkontaminata minn speċijiet oħra, is-soltu iżgħar (60). Jekk ikun hemm kontaminazzjoni, id-dud kollu għandu jinħasel fl-ilma f'dixx Petri. Eżemplari kbar adulti ta' *Enchytraeus albidus* imbagħad jintgħażlu (bl-użu ta' stereomikroskopju) biex tinbeda kultura ġdida. Id-dud l-ieħor kollu jitwarrab. Iċ-ċiklu ta' ħajtu huwa qasir minħabba li l-maturità tintlaħaq bejn 33 jum (fi 18 °C) u 74 jum (fi 12 °C). Kulturi biss li jkunu nżammu fil-laboratorju għal mill-anqas 5 ġimgħat (ġenerazzjoni waħda) mingħajr problemi għandhom jintużaw għat-test.

Speċijiet oħra tal-ġeneru *Enchytraeus* huma adatti wkoll, l-aktar *Enchytraeus luxuriosus*. Din l-ispeċi tassew tgħix fil-ħamrija, u kienet deskritta mill-ġdid f'(65). Jekk jintużaw speċijiet oħra ta' *Enchytraeus*, huma għandhom ikunu identifikati b'mod ċar u l-motiv għall-għażla tal-ispeċi għandu jkun irrappurtat.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) hija speċi tal-istess grupp bħal *Enchytraeus luxuriosus*. Ma nstabx li kienet teżisti b'ċertezza fil-qasam, minħabba li kienet deskritta biss minn kulturi ta' ħniex u munzelli ta' kompost (Römbke 2003). Il-ħtiġijiet oriġinali ekoloġiċi tagħha mhumiex għalhekk, magħrufin. Iżda, studji reċenti tal-laboratorju f'diversi oqsma ta' ħamrija kkonfermaw li din l-ispeċi għandha tolleranza wiesgħa għal proprjetajiet tal-ħamrija bħal pH u sawra (Jänsch et al. 2005). F'dawn l-aħħar snin din l-ispeċi sikwit kienet użata fi studi ekotossikoloġiċi minħabba s-sempliċità tat-trobbija u l-ittestjar tagħha (eż. Kuperman et al. 2003). Iżda hija żgħira: 3 – 12 mm; 7 mm bħala medja (Westheide & Müller 1996), u dan jagħmel l-immaniġġar aktar diffiċli mqabbel ma' dak ta' *Enchytraeus albidus*. Meta tintuża din l-ispeċi minflok *Enchytraeus albidus*, id-daqs tar-reċipjent tat-test jista' iżda ma jeħtiġlux ikun iżgħar. Barra minn dan, għandu jitqies li din l-ispeċi tirriproduċi b'mod mgħaġġel ħafna billi għandha żmien ta' ġenerazzjoni ta' anqas minn 20 jum f'20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) u wkoll aktar malajr f'temperaturi għola.

Enchytraeids tal-ispeċi *Enchytraeus albidus* (kif ukoll speċijiet *Enchytraeus* oħra) jistgħu jitrabbew f'kaxex kbar tal-plastik (eż. 30 × 60 × 10 cm jew 20 × 12 × 8 cm li huma adatti għal kultura ta' dud ta' daqs żgħir) mimlijin b'taħlita ta' ħamrija artifiċjali u li jistgħu jinkisbu kummerċjalment u b'ħamrija tal-ġnien mhux kontaminata, ħielsa minn addittivi. Materjal ta' kompost għandu jkun evitat minħabba li jista' jkun fih kimiċi tossiċi bħal metalli tqal. Il-fawna għandha titneħħa mill-ħamrija tat-trobbija qabel ma tintuża b'iffriżar għal tliet darbiet. Tista' tintuża wkoll ħamrija pura artifiċjali iżda r-rata ta' riproduzzjoni tista' tkun aktar bil-mod mqabbla ma' dik miksuba b'substrati mħallta. Is-substrat għandu jkollu pH ta' 6,0 ± 0,5. Il-kultura tinżamm f'inkubatur f'temperatura ta' 15 ± 2 °C mingħajr dawl. F'kull każ għandha tkun evitata temperatura ogħla minn 23 °C. L-irtuba tal-ħamrija artifiċjali/naturali għandha tkun niedja iżda mhux imxarrba. Meta l-ħamrija tingħafas bil-mod bl-idejn, għandhom joħorġu biss ftit qtar ta' ilma. F'kull każ, għandhom ikunu evitati kondizzjonijiet anossiċi (eż. jekk jintuża għatu, it-toqob tal-għatu għandhom ikunu għoljin biżżejjed li jipprovdu bdil suffiċjenti ta' arja). Il-ħamrija tat-trobbija għandha titrewwaħ billi titħawwad b'attenzjoni darba fil-ġimgħa.

▼M4

Id-dud għandu jintema' mill-anqas darba fil-ġimgħa sakemm jixba' bi fjokki tal-ħafur li jitqiegħdu f'ħofra fil-wiċċ tal-ħamrija u jitgħattew bil-ħamrija. Jekk fil-kontenitur ikun baqa' ikel mill-aħħar data ta' tmigħ, l-ammont ta' ikel mogħti għandu jkun aġġustat b'dan il-mod. Jekk fuq l-ikel li jifdal jikber il-faqqiegħ, huwa għandu jinbidel bi kwantità ġdida ta' fjokki ta' ħafur. Biex ir-riproduzzjoni tkun stimulata, il-fjokki tal-ħafur jistgħu jkunu ssupplimentati bi trab ta' proteini, disponibbli kummerċjalment, imtejjeb b'vitamini kull ġimagħtejn. Wara tliet xhur, l-annimali jkunu ttrasferiti għal kultura jew għal substrat ta' trobbija mħejjin friski. Il-fjokki tal-ħafur, li jkollhom jinħażnu f'reċipjenti ssiġillati, għandhom jissaħħnu f'awtoklav jew jissaħħnu qabel jintużaw biex ikunu evitati infezzjonijiet minn araknidi tad-dqiq (eż. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) jew minn araknidi tal-ħtif (eż. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Wara li jkun iddiżinfettat, l-ikel jintaħan biex ikun jista' jitferrex faċilment fuq il-wiċċ tal-ħamrija. Sors ieħor possibbli ta' ikel huwa l-ħmira tal-furnar jew l-ikel tal-ħut TetraMin®.

Inġenerali, il-kondizzjonijiet tal-mod ta' kultura jkunu suffiċjenti jekk id-dud ma jippruvax jitlaq mis-substrat, ma jiċċaqlaqx malajr fil-ħamrija, ma jurix wiċċ estern ileqq mingħajr partiċelli ta' ħamrija mwaħħlin miegħu, ikun ftit jew wisq ta' lewn bajdani u jekk ikun jidher dud ta' etajiet differenti. Fil-fatt dud jista' jitqies li jkun f'saħħtu jekk jipproduċi kontinwament.

Referenzi magħżula addizzjonali

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.

▼M6

C.31. TEST TAL-PJANTA TERRESTRI: TFAĊĊJAR TAN-NEBBIET U TEST TAT-TKABBIR TAN-NEBBIET

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tal-Ittestjar (TG) 208 tal-OECD (2006). Il-metodi tal-ittestjar jiġu perjodikament irriveduti fid-dawl tal-progress xjentifiku u l-applikabbiltà għall-użu regolatorju. Dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat huwa maħsub biex jivvaluta l-effetti potenzjali tas-sustanzi kimiċi fuq it-tfaċċar u t-tkabbir tan-nebbiet. Bħala tali ma jkoprix l-effetti kroniċi jew l-effetti fuq ir-riproduzzjoni (jiġifieri sett ta' żrieragħ, il-formazzjoni tal-fjura, maturazzjoni tal-frott). Il-kundizzjonijiet tal-espożizzjoni u proprjetajiet tas-sustanza kimika li għandha tiġi ttestjata għandhom jiġu kkunsidrati biex jiżguraw li jintużaw metodi ta' ttestjar xierqa (eż. meta jiġu ttestjati metalli/komposti tal-metall, għandhom jiġu kkunsidrati l-effetti tal-pH u l-kontrojoni assoċjati) (1). Dan il-metodu ta' ttestjar ma għandux jindirizza l-pjanti esposti għal fwar tas-sustanzi kimiċi. Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ġenerali, il-bijoċidi u l-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti (magħrufa wkoll bħala l-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti jew il-pestiċidi). Dan ġie żviluppat abbażi tal-metodi eżistenti (2) (3) (4) (5) (6) (7). Kienu kkunsidrati wkoll referenzi oħra pertinenti għall-ittestjar tal-pjanti (8) (9) (10). Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAL-ITTESTJAR

2. It-test jivvaluta l-effetti fuq it-tfaċċar tan-nebbiet u t-tkabbir bikri ta' pjanti ogħla wara espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija (jew matriċi tal-ħamrija xierqa oħra). Iż-żrieragħ jitqiegħdu f'kuntatt ma' ħamrija trattata bis-sustanza kimika tat-test u evalwata għall-effetti li ġejjin normalment 14-21 jum wara 50 % ħolqien tan-nebbieta fil-grupp ta' kontroll. Il-punti ta' tmiem imkejla huma valutazzjoni viżwali tal-ħolqien tan-nebbieta, piż tan-nebbieta niexfa (inħejja piż tan-nebbieta frisk) u f'ċerti każijiet l-għoli tan-nebbieta, kif ukoll valutazzjoni tal-effetti detrimentali viżibbli f'partijiet differenti tal-pjanta. Dawn il-kejliet u osservazzjonijiet jitqabblu ma' dawk ta' pjanti ta' kontroll mhux ittrattati.

3. Skont ir-rotta mistennija tal-espożizzjoni, is-sustanza kimika tat-test hija inkorporata fil-ħamrija (jew possibbilment f'matriċi tal-ħamrija artifiċjali) jew applikata mal-wiċċ tal-ħamrija, li tirrappreżenta b'mod xieraq ir-rotta potenzjali tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika. L-inkorporazzjoni tal-ħamrija ssir billi tiġi ttrattata l-ħamrija aggregata. Wara l-applikazzjoni, il-ħamrija tiġi ttrasferita fil-qsari, u mbagħad żrieragħ tal-ispeċi tal-pjanti partikolari jinżergħu fil-ħamrija. L-applikazzjonijiet fuq il-wiċċ isiru f'ħamrija fil-qsari fejn diġa nżergħu ż-żrieragħ. L-unitajiet tal-ittestjar (kontrolli u ħamriji ttrattati flimkien maż-żrieragħ) imbagħad jitqiegħdu f'kundizzjonijiet xierqa biex tiġi appoġġjata l-ġerminazzjoni/tkabbir tal-pjanti.

4. It-test jista' jitwettaq sabiex tiġi ddeterminata l-kurva ta' doża-rispons, jew konċentrazzjoni/rata unika bħala test tal-limitu skont l-għan tal-istudju. Jekk ir-riżultati mit-test tal-konċentrazzjoni/rata jaqbżu ċertu livell ta' tossiċità (eż. jekk jiġu osservati effetti ikbar minn x %), jitwettaq test tas-sejba tal-medda biex jiġu ddeterminati l-limiti superjuri u inferjuri għat-tossiċità segwiti minn test tal-konċentrazzjoni/rata biex tiġi ġġenerata kurva ta' doża-rispons. Analiżi statistika xierqa tintuża biex tinkiseb konċentrazzjoni EC_x effikaċi jew rata ta' applikazzjoni effikaċi ER_x (eż. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) għall-parametru/parametri l-iktar sensittivi ta' interess. Barra minn hekk, f'dan it-test tista' tiġi kkalkolata l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) u l-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

5. L-informazzjoni li ġejja hija utli għall-identifikazzjoni tar-rotta mistennija tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika u fit-tfassil tat-test: il-formula strutturali, il-purità, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fis-solventi organiċi,

▼M6

il-koeffiċjent tal-partizzjoni 1-ottanol/ilma, l-imġiba tas-sorbiment tal-ħamrija, il-pressjoni tal-fwar, l-istabbiltà kimika fl-ilma u d-dawl, u l-bijodegradabbiltà.

VALIDITÀ TAT-TEST

6. Sabiex it-test jiġi kkunsidrat validu, il-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati fil-kontrolli:

— it-tfaċċar ta' nebbietahuwa tal-inqas 70 %;

— in-nebbieta ma jurux effetti fitotossiċi viżibbli (eż. kloroži, nekroži, dbiel, deformazzjoni tal-weraq u zkuk) u l-pjanti jesibixxu biss varjazzjoni normali fit-tkabbir u l-morfoloġija għal dik l-ispeċi partikolari;

— is-sopravivenza medja tan-nebbieta ta' kontroll li nħolqu hija tal-inqas 90 % għad-durata tal-istudju;

— kundizzjonijiet ambjentali għal speċi partikolari huma identiċi u l-midjums tat-tkabbir fihom l-istess ammont tal-matriċi tal-ħamrija, il-midjums ta' appoġġ, jew sottostrat għall-istess sors.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

7. Sustanza kimika ta' referenza jaf tiġi ttestjata f'intervalli regolari, biex tiġi vverifikata l-prestazzjoni tat-test u r-rispons tal-pjanti tat-test partikolari u l-kundizzjonijiet tat-test ma nbidlux b'mod sinifikanti maż-żmien. Inkella, il-bijomassa storika jew il-kejl tat-tkabbir tal-kontrolli jistgħu jintużaw biex jevalwaw il-prestazzjoni tas-sistema f'laboratorji partikolari, u jistgħu jservu bħala miżura ta' kontroll tal-kwalità ġol-laboratorju.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Ħamrija naturali — Sottostrat artifiċjali

8. Il-pjanti jistgħu jitkabbru fi qsari permezz ta' ħamrija ramlija, ramel lomuż, jew ħamrija taflija bir-ramel li fiha sa 1,5 fil-mija karbonju organiku (madwar 3 fil-mija materja organika). Jistgħu jintużaw ukoll ħamrija għat-twaħħil kummerċjali jew taħlita ta' ħamrija sintetika li fihom sa 1,5 fil-mija karbonju organiku. Il-ħamrija taflija ma għandhiex tintuża jekk is-sustanza kimika tat-test tkun magħrufa li għandha affinità għolja għat-tafal. Il-ħamrija tas-sit għandha tintgħarbel għal 2 mm daqs tal-frak sabiex tiġi omoġenizzata u jitneħħa l-frak oħxon. Għandu jiġi rrapportat it-tip u l-konsistenza, % karbonju organiku, il-pH u l-kontenut tal-melħ bħala konduttività elettronika tal-ħamrija mħejjija finali. Il-ħamrija għandha tiġi kklassifikata skont skema ta' klassifikazzjoni standard (11). Il-ħamrija tista' tiġi pasturizzata jew ittrattata bis-sħana sabiex jitnaqqas l-effett tal-patoġeni tal-ħamrija.

9. Il-ħamrija naturali tista' tikkomplika l-interpretazzjoni tar-riżultati u żżid l-varjabbiltà minħabba proprjetajiet fiżiċi/kimiċi u popolazzjonijiet mikrobjali differenti. Dawn il-varjabbli sussegwentement ibiddlu l-kapaċità ta' żamma ta' umdità, il-kapaċità ta' rbit tas-sustanzi kimiċi, l-arjazzjoni, u l-kontenut tal-elementi tan-nutrijenti u t-traċċi. Minbarra l-varjazzjonijiet għal dawn il-fatturi fiżiċi, sejjer ikun hemm ukoll varjazzjoni fil-proprjetajiet kimiċi bħall-pH u l-potenzjal ta' redox, li tista' taffettwa l-bijodisponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test (12) (13) (14).

10. Is-sottostrati artifiċjali ġeneralment ma jintużawx għall-ittestjar ta' prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, iżda jistgħu jkunu ta' użu għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi ġenerali jew fejn ikun mixtieq li titnaqqas il-varjabbiltà tal-ħamrija naturali u tiżdied il-paragunabbiltà tar-riżultati tat-test. Is-sottostrati użati għandhom ikunu komposti ta' materjali inerti li jnaqqsu l-interazzjoni mas-sustanza kimika tat-test, il-portatur tas-solvent, jew it-tnejn li huma. Ramel kwarzuż maħsul bl-aċidu, suf minerali u żibeġ tal-ħġieġ (eż. b'dijametru bejn 0,35 u 0,85 mm) instabu li huma materjali inerti xierqa li

▼M6

jassorbu minimalment is-sustanza kimika tat-test (15), u dan jiżgura li s-sustanza kimika tkun disponibbli kemm jista' jkun kollha għaż-żerriegħa permezz tat-teħid mill-għeruq. Is-sottostrati mhux xierqa, ikunu jinkludu vermikolat, perlajt jew materjali oħra assorbenti ħafna. Għandhom jiġu pprovduti nutrijenti għat-tkabbir tal-pjanti biex jiġi żgurat li l-pjanti ma jkunux taħt stress minħabba nuqqasijiet ta' nutrijenti, u fejn ikun possibbli dan għandu jiġi vvalutat permezz ta' analiżi tas-sustanzi kimiċi jew b'valutazzjoni viżwali tal-pjanti ta' kontroll.

Kriterji għall-għażla tal-ispeċijiet tat-test

11. L-ispeċijiet magħżula għandhom ikunu raġonevolment varjati, eż. meta wieħed iqis id-diversità tassonomika tagħhom fir-renju tal-pjanti tagħhom, id-distribuzzjoni tagħhom, l-abbundanza, il-karatteristiċi taċ-ċiklu tal-ħajja speċifiku għall-ispeċi u r-reġjun ta' okkorrenza naturali, biex tiġi żviluppata medda ta' risponsi (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Il-karatteristiċi li ġejjin tal-ispeċijiet tat-test possibbli għandhom jiġu kkunsidrati fl-għażla:

— l-ispeċijiet għandhom żerriegħa uniformi li huma disponibbli minnufih minn sors(i) standard affidabbli ta' żerriegħa u li jipproduċu ġerminazzjoni konsistenti, affidabbli u ugwali, kif ukoll tkabbir tan-nebbieta uniformi;

— il-pjanta hija soġġetta għall-ittestjar fil-laboratorju, u tista' tagħti riżultati affidabbli u riproduċibbli fi ħdan u fil-faċilitajiet ta' ttestjar kollha;

— is-sensittività tal-ispeċijiet ittestjati għandha tkun konsistenti mar-risponsi tal-pjanti misjuba fl-ambjent espost għas-sustanza kimika;

— dawn intużaw sa ċertu punt f'testijiet tat-tossiċità preċedenti u l-użu tagħhom, pereżempju, f'bijoassaġġi tal-ħaxix, skrinjar ta' metalli tqal, testijiet tas-salinità jew it-testijiet tal-istress minerali jew studji tal-allelopatija jindika sensittività għal varjetà wiesgħa ta' fatturi li joħolqu pressjoni;

— huma kompatibbli mal-kundizzjonijiet ta' tkabbir tal-metodu ta' ttestjar;

— jissodisfaw il-kriterji ta' validità tat-test.

Xi whud mill-ispeċijiet tat-test l-iktar storikament użati huma elenkati fl-Appendiċi 2 u l-ispeċijiet li potenzjalment mhumiex pjanti fl-Appendiċi 3.

12. In-numru ta' speċijiet li għandhom jiġu ttestjati jiddependi fuq ir-rekwiżiti regolatorji rilevanti, għalhekk mhuwiex speċifikat f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

13. Is-sustanza kimika għandha tiġi applikata f'portatur xieraq (eż. ilma, aċetun, etanol, polietilen glikol, gomma Għarbija, ramel). Taħlitiet (prodotti formulati jew formulazzjonijiet) li jkun fihom ingredjenti attivi u diversi aġġuvanti jistgħu jiġu ttestjati wkoll.

Inkorporazzjoni f'ħamrija/sottostrat artifiċjali

14. Is-sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jew huma suspiżi fl-ilma jistgħu jiżdiedu mal-ilma, u mbagħad is-soluzzjoni titħallat mal-ħamrija b'apparat ta' taħlit xieraq. Dan it-tip ta' test jista' jintuża jekk l-espożizzjoni għas-sustanza kimika tkun permezz tal-ħamrija jew ilma interstizjali tal-ħamrija u li hemm tħassib li tinġibed mill-għeruq. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma tal-ħamrija ma għandhiex tinqabeż biż-żieda tas-sustanza kimika tat-test. Il-volum ta' ilma miżjud għandu jkun l-istess għal kull konċentrazzjoni tat-test, iżda għandu jkun limitat biex jiġi evitat it-tagħqid agglomerat tal-ħamrija.

▼M6

15. Is-sustanzi kimiċi b'solubbiltà fl-ilma baxxa għandhom jinħallu f'solvent volatili xieraq (eż. aċetun, etanol) u mħallta bir-ramel. Imbagħad is-solvent jista' jitneħħa mir-ramel permezz ta' fluss ta' arja filwaqt li jitkompla jitħallat ir-ramel. Ir-ramel ittrattat jitħallat mal-ħamrija sperimentali. Jiġi stabbilit kontroll ieħor li jirċievi ramel u solvent biss. Jiżdiedu ammonti ugwali ta' ramel, b'solvent imħallat u mneħħi mal-livelli ta' trattament kollha u t-tieni kontroll. Għal sustanzi kimiċi tat-test solidi u li ma jinħallux, il-ħamrija xotta u s-sustanza kimika jitħalltu f'apparat ta' taħlit xieraq. Minn hawn 'il quddiem, il-ħamrija titpoġġa fil-qsari u ż-żerriegħa tinżera' minnufih.

16. Meta jintuża sottostrat artifiċjali minflok il-ħamrija, is-sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jistgħu jinħallu fis-soluzzjoni tan-nutrijenti eżattament qabel il-bidu tat-test. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma, li iżda jistgħu jiġu sospiżi fl-ilma permezz ta' portatur ta' solvent, għandhom jiżdiedu mal-portatur, mas-soluzzjoni tan-nutrijenti. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma, li għalihom m'hemm disponibbli ebda portatur mhux tossiku li jinħall fl-ilma, għandhom jinħallu f'solvent volatili xieraq. Is-soluzzjoni kimika titħallat mar-ramel jew maż-żibeġ tal-ħġieġ, titpoġġa f'apparat vakwu rotatorju, u tiġi evaporata, biex tibqa' kisja uniformi ta' sustanza kimika fuq ir-ramel jew iż-żibeġ. Porzjon ippeżat ta' żibeġ għandu jiġi estratt bl-istess solvent organiku u s-sustanza kimika tiġi assaġġjatta qabel jimtlew il-kontenituri tal-qsari.

Applikazzjoni fuq il-wiċċ

17. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, ħafna drabi wiċċ il-ħamrija tiġi sprejjata bis-soluzzjoni tat-test għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. It-tagħmir kollu użat fit-twettiq tat-testijiet, inkluż it-tagħmir użat biex tiġi ppreparata u tingħata s-sustanza kimika tat-test, għandu jkun ta' tali disinn u kapaċità li t-testijiet li jinvolvu dan it-tagħmir jistgħu jitwettqu b'mod preċiż u li jagħti kopertura riproduċibbli. Il-kopertura għandha tkun uniformi fl-uċuħ tal-ħamrija kollha. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-possibbiltà li s-sustanzi kimiċi jiġu adsorbiti mit-tagħmir jew ikun hemm reazzjoni miegħu (eż. tubi tal-plastik u sustanzi kimiċi lipofiliċi jew parts u elementi tal-azzar). Is-sustanza kimika tat-test tiġi sprejata fuq wiċċ il-ħamrija b'simulazzjoni ta' applikazzjonijiet tat-tank tal-isprej tipiċi. Ġeneralment, il-volumi tal-isprej għandhom ikunu fil-medda ta' prattika agrikola normali u l-volumi (għandu jiġi rrapportat l-ammont ta' ilma, eċċ). It-tip ta' żennuna għandha tintgħażel biex tipprovdi kopertura uniformi ta' wiċċ il-ħamrija. Jekk jiġu applikati solventi u portaturi, għandu jiġi stabbilit grupp ieħor ta' pjanti ta' kontroll li jirċievi biss is-solvent/portatur. Dan mhuwiex meħtieġ għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti ttestjati bħala formulazzjonijiet.

Verifika tal-konċentrazzjoni/rata tas-sustanza kimika tat-test

18. Il-konċentrazzjonijiet/rati ta' applikazzjoni għandhom jiġu kkonfermati minn verifika analitika xierqa. Għal sustanzi kimiċi li jinħallu, verifika tal-konċentrazzjonijiet/rati tat-test kollha tista' tiġi kkonfermata b'analiżi tal-ogħla konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tat-test għat-test b'dokumentazzjoni dwar id-dilwizzjoni sussegwenti u l-użu ta' tagħmir ta' applikazzjoni kkalibrat (eż. oġġetti tal-ħġieġ analitiċi kkalibrati, kalibrazzjoni tat-tagħmir ta' applikazzjoni tal-isprejer). Għal sustanzi kimiċi li ma jinħallux, għandha tiġi pprovduta verifika tal-materjal kompost bil-piżijiet tas-sustanza kimika tat-test miżjuda mal-ħamrija. Jekk ikun hemm bżonn ta' dimostrazzjoni ta' omoġenità, jaf tkun meħtieġa analiżi tal-ħamrija.

PROĊEDURA

Disinn tat-test

19. Iż-żrieragħ tal-istess speċi jitħawlu fil-qsari. In-numru ta' żrieragħ miżrugħa f'kull qasrija sejjer jiddependi skont l-ispeċi, id-daqs tal-qasrija u d-durata tat-test. In-numru ta' pjanti f'kull qasrija għandu jipprovdi kundizzjonijiet ta' tkabbir adegwati u jevita ffullar matul it-test. Id-densità massima ta' pjanti

▼M6

għandha tkun 3 — 10 żrieragħ f'kull 100 cm^2 skont id-daqs taż-żrieragħ. Eż., hija rakkomandata pjanta tal-qamħ, tas-sojja, tat-tadam, tal-ħjar, jew tal-pitravi taz-zokkor f'kull kontenitur ta' 15 cm; tliet pjanti tal-kolza jew tal-piżelli f'kull kontenitur ta' 15 cm; u 5 sa 10 basliet, qamħ, jew żrieragħ żgħar oħra f'kontenitur ta' 15 cm. In-numru ta' żrieragħ u qsari repliki (ir-replikat huwa ddefinit bħala qasrija, għalhekk il-pjanti fl-istess qasrija ma jikkostitwixxux replikat) għandu jkun adegwat għall-aħjar analiżi statistika (21). Wieħed għandu jinnota li l-varjabbiltà sejra tkun ikbar għall-ispeċijiet tat-test permezz ta' inqas żrieragħ kbar f'kull qasrija (repliki), meta mqabbel mal-ispeċijiet tat-test fejn huwa possibbli li jintużaw numri ikbar ta' żrieragħ f'kull qasrija. Bit-tħawwil ta' numru ugwali ta' żrieragħ f'kull qasrija, din il-varjabbiltà tista' titnaqqas.

20. Jintużaw gruppi ta' kontroll biex jiġi assigurat li l-effetti osservati huma assoċjat mal-espożizzjoni tas-sustanza kimika tat-test jew attribwita lilha. Il-grupp ta' kontroll xieraq għandu jkun identiku f'kull aspett għall-grupp tat-test ħlief għall-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test. F'test partikolari, il-pjanti tal-ittestjar kollha inkluż il-kontrolli għandhom ikunu mill-istess sors. Biex tkun evitata imparzjalità, hija meħtieġa assenjazzjoni każwali tal-qsari tat-test u ta' kontroll.

21. Għandhom jiġu evitati żrieragħ miksija b'insettiċidju jew fungiċidju (jiġifieri żrieragħ "imlibbsa"). Madankollu, l-użu ta' ċerti fungiċidji ta' kuntatt mhux sistemiku (eż. captan, thiram) huwa permess minn xi awtoritajiet regolatorji (22). Jekk il-patoġeni li jinġarru miż-żerriegħa huma ta' tħassib, iż-żrieragħ jistgħu jixxarbu għal ftit ħin f'soluzzjoni ta' 5 % ipoklorit dgħajfa, imbagħad jitlaħalħu b'mod esteniv taħt l-ilma tal-vit u jitnixxfu. Mhuwa permess ebda trattament rimedjali bi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti oħrajn.

Kundizzjonijiet tat-test

22. Il-kundizzjonijiet tat-test għandhom ikunu kemm jista' jkun l-istess bħal dawk il-kundizzjonijiet meħtieġa għat-tkabbir normali għall-ispeċijiet u l-varjetajiet ittestjati (Appendiċi 4 jipprovdi eżempji tal-kundizzjonijiet tat-test). Il-pjanti ġodda għandhom jinżammu bi prattiki ortikulturali ġodda f'kmamar b'ambjent ikkontrollat, fitotroni, jew serer. Meta jintużaw faċilitajiet tat-tkabbir, dawn il-prattiki ġeneralment jinkludu reġistrazzjoni ta' kontroll u adegwatament frekwenti (eż. kuljum) tat-temperatura, l-umdità, il-konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju, id-dawl (l-intensità, it-tul tal-mewġa, ir-radjazzjoni attiva fotosintetikament) u l-perjodu ta' dawl, mezzi ta' tisqija, eċċ, biex jiġi assigurat tkabbir tajjeb tal-pjanti kif iġġudikat mill-pjanti ta' kontroll tal-ispeċijiet magħżulin. It-temperaturi tas-serer għandhom jiġu kkontrollati permezz ta' sistemi ta' ventilazzjoni, tisħin u/jew tkessiħ. Ġeneralment, il-kundizzjonijiet li ġejjin huma rakkomandati għall-ittestjar tas-serer:

— temperatura: 22 °C ± 10 °C;

— umdità: 70 % ± 25 %;

— fotoperjodu: minimu ta' 16-il siegħa ta' dawl;

— intensità tad-dawl: 350 ± 50 $\mu E/m_2/s$. Jaf ikun meħtieġ dawl addizzjonali jekk l-intensità tonqos taħt 200 $\mu E/m_2/s$, tul tal-mewġa 400 — 700 nm ħlief għal ċerti speċijiet li għandhom inqas rekwiżiti ta' dawl.

Il-kundizzjonijiet ambjentali għandhom jiġu ssorveljati u rrapportati matul l-istudju. Il-pjanti għandhom jitkabbru f'plastik mhux poruż jew qsari bi ħġieġ doppju bi trej jew plattina taħt il-qasrija. Il-qsari jistgħu jitqiegħdu f'post

▼M6

ieħor kull ċertu żmien biex titnaqqas il-varjabbiltà fit-tkabbir tal-pjanti (minħabba d-differenzi fil-kundizzjonijiet tat-test fi ħdan il-faċilitajiet ta' tkabbir). Il-qsari għandhom ikunu kbar biżżejjed biex jippermettu tkabbir normali.

23. In-nutrijenti tal-ħamrija jistgħu jiġu ssupplimentati kif meħtieġ biex jinżamm vigur tajjeb tal-pjanti. Il-ħtieġa u l-għażla tal-ħin ta' nutrijenti addizzjonali tista' tiġi ġġudikata bl-osservazzjoni tal-pjanti ta' kontroll. Hija rakkomandata t-tisqija mill-qiegħ tal-kontenituri tat-test (eż. permezz ta' ftejjel tal-fibra tal-ħġieġ). Madankollu, tista' tintuża tisqija inizjali minn fuq biex tiġi stimulata l-ġerminazzjoni taż-żieragħ, u għall-applikazzjoni fuq wiċċ il-ħamrija, tiffaċilita l-moviment tas-sustanza kimika fil-ħamrija.

24. Il-kundizzjonijiet ta' tkabbir speċifiċi għandhom ikunu xierqa għall-ispeċijiet ittestjati u s-sustanza kimika tat-test investigata. Il-pjanti ta' kontroll u ttrattati għandhom jinżammu fl-istess kundizzjonijiet, madankollu għandhom jittieħdu miżuri adegwati biex tiġi evitata espożizzjoni inkroċjata (eż. ta' sustanzi kimiċi volatili) bejn trattamenti differenti u tal-kontrolli għas-sustanza kimika tat-test.

Ittestjar f'konċentrazzjoni/rata unika

25. Sabiex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni/rata xierqa ta' sustanza kimika għat-twettiq ta' test (ta' sfida/limitu) tar-rata jew ta' konċentrazzjoni unika, għandhom jiġu kkunsidrati bosta fatturi. Għal sustanzi kimiċi ġenerali, dawn jinkludu l-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi tas-sustanza kimika. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, il-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi u l-mudell ta' użu tas-sustanza kimika tat-test, jeħtieġ li tiġi kkunsidrata l-konċentrazzjoni massima jew ir-rata ta' applikazzjoni, in-numru ta' applikazzjonijiet f'kull staġun u/jew il-persistenza tas-sustanza kimika tat-test. Biex jiġi ddeterminat jekk sustanza kimika ġenerali għandhiex proprjetajiet fitotossiċi, jaf ikun xieraq li jiġi ttestjat il-livell massimu ta' ħamrija xotta ta' 1 000 mg/kg.

Test tas-sejba tal-medda

26. Meta jkun meħtieġ jista' jitwettaq test tas-sejba tal-medda biex jipprovdi gwida dwar il-konċentrazzjonijiet/rati li għandhom jiġu ttestjati fi studju finali dwar ir-rispons għad-doża. Għat-test tas-sejba tad-doża, il-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar għandhom jiġu spazjati sew (eż. ħamrija xotta ta' 0,1, 1,0, 10, 100 u 1 000 mg/kg). Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, il-konċentrazzjonijiet/rati jistgħu jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjoni jew ir-rata ta' applikazzjoni rakkomandata jew massima, eż. 1/100, 1/10, 1/1 tal-konċentrazzjoni jew rata ta' applikazzjoni rakkomandata/massima.

Ittestjar f'konċentrazzjonijiet/rati multipli

27. Il-fini tat-test b'konċentrazzjonijiet/rati multipli huwa li jistabbilixxi relazzjoni bejn id-doża u r-rispons u li jiġi ddeterminat il-valur EC_x jew ER_x għat-tfaċċar, il-bijomassa u/jew l-effetti viżwali meta mqabbel ma' kontrolli mhux esposti, kif meħtieġ mill-awtoritajiet regolatorji.

28. In-numru u l-ispazju tal-konċentrazzjonijiet jew ir-rati għandhom ikunu biżżejjed biex jiġġeneraw relazzjoni bejn id-doża u r-rispons u l-ekwazzjoni tar-rigressjoni u jagħti stima tal-EC_x jew ER_x. Il-konċentrazzjonijiet/rati magħżula għandhom jinkludu l-valuri EC_x jew ER_x li għandhom jiġu ddeterminati. Pereżempju, jekk ikun meħtieġ valur EC_{50} huwa rakkomandabbli li jsir ittestjar f'rati li jipproduċu effett bejn 20 sa 80 %. In-numru rakkomandat tal-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar biex jintlaħaq dan huwa tal-inqas ħamsa f'serje ġeometrika flimkien ma' kontroll mhux ittrattat, u

▼M6

spazjat b'fattur li ma jaqbiżx tlieta. Għal kull grupp ta' trattament u kontroll, in-numru ta' repliki għandu jkun tal-inqas erbgħa u n-numru totali ta' żrieragħ għandu jkun tal-inqas 20. Iktar repliki ta' ċerti pjanti b'rata ta' ġerminazzjoni baxxa jew b'drawwiet ta' tkabbir varjabbli jaf ikunu meħtieġa biex tiżdied is-setgħa statistika tat-test. Jekk jintużaw numru kbir ta' konċentrazzjonijiet/rati tat-test, jista' jitnaqqas in-numru ta' repliki. Jekk trid tiġi stmata l-NOEC, jaf ikunu meħtieġa iktar repliki biex tinkiseb s-setgħa statistika mixtieqa (23).

Osservazzjonijiet

29. Matul il-perjodu ta' osservazzjoni, jiġifieri bejn 14 u 21 jum wara li tfaċċaw 50 % tal-pjanti ta' kontroll (il-kontrolli ta' solventi ukoll, jekk ikun applikabbli), il-pjanti huma osservati frekwentement (tal-inqas kull ġimgħa u jekk ikun possibbli kuljum) għat-tfaċċar u l-fitototossiċità u l-mortalità viżwali. Fi tmiem it-test, għandu jiġi rreġistrat il-kejl tat-tfaċċar perċentwali u l-bijomassa tal-pjanti li jibqgħu ħajjin, kif ukoll l-effetti detrimentali viżibbli fil-partijiet differenti tal-pjanta. Din tal-aħħar tinkludi anormalitajiet fid-dehra taż-żrieragħ li tfaċċaw, twaqqif tat-tkabbir, klorożi, skolorazzjoni, mortalità, u effetti fuq l-iżvilupp tal-pjanta. Il-bijomassa finali tista' titkejjel permezz tal-piż xott medju tan-nebbieta tal-pjanti li jibqgħu ħajjin, billi n-nebbieta tinżera' f'wiċċ il-ħamrija u titnixxef għal piż kostanti ta' 60 °C. Inkella, il-bijomassa finali tista' titkejjel permezz tal-piż frisk tan-nebbieta. L-għoli tan-nebbieta jaf ikun punt ta' tmiem ieħor, jekk ikun meħtieġ mill-awtoritajiet regolatorji. Għandha tintuża sistema ta' punteġġi uniformi għal dannu viżwali biex jiġu evalwati r-risponsi tossiċi osservabbli. Fir-referenzi (23) (24), ingħataw eżempji għat-twettiq ta' klassifikazzjonijiet viżwali kwalitattivi jew kwantitattivi.

DEJTA U RAPPORTAR

Analiżi statistika

Test f'konċentrazzjoni/rata waħda

30. Dejta għal tali speċijiet ta' pjanti għandha tiġi analizzata permezz ta' metodu statistiku xieraq (21). Għandu jiġi rrapportat il-livell ta' effett fil-konċentrazzjoni/rata tat-test, jew in-nuqqas ta' lħuq ta' effett partikolari fil-konċentrazzjoni/rata tat-test (eż., < *x* % l-effett osservat f'konċentrazzjoni jew rata *y*)

Test f'konċentrazzjoni/rata multipla

31. Hija stabbilita relazzjoni bejn id-doża u r-rispons f'termini ta' ekwazzjoni ta' rigressjoni. Jistgħu jintużaw mudelli differenti: pereżempju, biex jiġu stmati l-EC_x jew ER_x (eż. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) u l-limiti ta' kunfidenza għat-tfaċċar bħald-dejta kwantali, il-metodi logit, probit, Weibull, Spearman-Karber, Spearman-Karber trimmjat, eċċ jistgħu jkunu xierqa. Għat-tkabbir tan-nebbieta (piż u għoli) bħala punti ta' tmiem kontinwi EC_x jew ER_x u l-limiti ta' kunfidenza tiegħu, jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (eż. analiżi tar-rigressjoni mhux lineari Bruce-Versteeg (25)). Kull meta jkun possibbli, l-R^2 għandu jkun 0,7 jew ogħla għall-biċċa l-kbira tal-ispeċijiet sensittivi u l-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar użati biex jinkludu effetti bejn 20 % u 80 %. Jekk għandha tiġi stmata l-NOEC, l-applikazzjoni ta' testijiet statistiċi b'saħħithom għandu jkun ippreferut u dawn għandhom jintgħażlu abbażi tad-distribuzzjoni tad-dejta (21) (26).

Rapport tat-test

32. Ir-rapport tat-test għandu jippreżenta riżultati tal-istudji kif ukoll deskrizzjoni ddettaljata tal-kundizzjonijiet tat-test, diskussjoni fid-dettall tar-riżultati, analiżi tad-dejta, u l-konklużjonijiet miġbura mill-analiżi. Għandu jiġi pprovdut sommarju tabulari u silta mir-riżultati. Ir-rapport għandu jinkludi dawn li ġejjin:

▼**M6**

Sustanza kimika tat-test:

— dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanza kimika, proprjetajiet rilevanti tas-sustanza kimika ttestjata (eż. log P_{ow}, solubbiltà fl-ilma, pressjoni tal-fwar u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba ambjentali, jekk tkun disponibbli);

— dettalji dwar it-tħejjija tas-soluzzjoni tat-test u l-verifika tal-konċentrazzjonijiet tat-test kif speċifikat fil-paragrafu 18.

Speċijiet tat-test:

— dettalji dwar l-organiżmu tat-test: speċi/varjetà, familji tal-pjanti, ismijiet xjentifiċi u komuni, sors u storja taż-żerriegħa kemm jista' jkun iddettaljata (jiġifieri isem il-fornitur, ġerminazzjoni perċentwali, klassi tad-daqs, lott jew numru tal-lott taż-żerriegħa, lott jew numru tal-lott, sena taż-żerriegħa jew staġun tat-tkabbir meta nġabret, klassifikazzjoni tad-data ta' ġerminazzjoni) vijabbiltà, eċċ;

— numru ta' monospeċijiet u speċijiet di-kotiledon ittestjati;

— raġunament għall-għażla tal-ispeċijiet;

— deskrizzjoni tal-ħżin, it-trattament u ż-żamma taż-żerriegħa.

Kundizzjonijiet tat-test:

— faċilità tal-ittestjar (eż. kompartiment tat-tkabbir, fitotron u serra);

— deskrizzjoni tas-sistema tat-test (eż. il-qisien tal-qsari, il-materjal tal-qsari l-ammonti ta' ħamrija);

— karatteristiċi tal-ħamrija (konsistenza jew tip ta' ħamrija: distribuzzjoni u klassifikazzjoni tal-frak tal-ħamrija, proprjetajiet fiżiċi u kimiċi inkluż l- % ta' materja organika, l- % tal-karbonju organiku u l-pH);

— preparazzjoni ta' ħamrija/sottostrat (eż. ħamrija, ħamrija artifiċjali, ramel u oħrajn) qabel it-test;

— deskrizzjoni tal-midjum tan-nutrijenti jekk jintuża;

— applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: deskrizzjoni tal-metodu ta' applikazzjoni, deskrizzjoni tat-tagħmir, rati ta' espożizzjoni u volumi li jinkludu l-verifika tas-sustanza kimika, deskrizzjoni tal-metodu ta' kalibrazzjoni u deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet ambjentali matul l-applikazzjoni;

— kundizzjonijiet tat-tkabbir: intensità tad-dawl (eż. PAR, radjazzjoni fotosintetikament attiva), fotoperjodu, temperaturi massimi/minimi, skeda u metodu tat-tisqija, fertilizzazzjoni;

— numru ta' żrieragħ f'kull qasrija, numru ta' pjanti għal kull doża, numru ta' repliki (qsari) għal kull rata ta' espożizzjoni;

— tip u numru ta' kontrolli (kontrolli negattivi u/jew pożittivi, kontroll tas-solvent jekk jintuża);

— durata tat-test.

Riżultati:

— tabella tal-punti tat-tmiem kollha għal kull replikat, il-konċentrazzjoni/-rata tat-test u l-ispeċijiet;

— in-numru u t-tfaċċar perċentwali meta mqabbel mal-kontrolli;

— il-kejliet tal-bijomassa (piż xott jew piż frisk tan-nebbieta) tal-pjanti bħala perċentwal tal-kontrolli;

▼M6

— l-għoli tan-nebbieta tal-pjanti bħala l-perċentwal tal-kontrolli, jekk imkejjel;

— dannu viżwali perċentwali u deskrizzjoni kwalitattiva u kwantitattiva tad-dannu viżwali (klorożi, nekrożi, dbiel, deformazzjoni tal-weraq u z-zokk, kif ukoll kwalunkwe nuqqas ta' effetti) mis-sustanza kimika tat-test meta mqabbel mal-pjanti ta' kontroll;

— deskrizzjoni tal-iskala tal-klassifikazzjoni użata biex jiġi ġġudikat id-dannu viżwali, jekk tiġi pprovduta klassifikazzjoni viżwali;

— għal studji tar-rata unika, għandu jiġi rrapportat id-dannu perċentwali;

— Il-valuri EC_x jew ER_x (eż. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) u l-limiti ta' kunfidenza relatati. Meta titwettaq l-analiżi tar-rigressjoni, ipprovdi l-iżball standard għall-ekwazzjoni tar-rigressjoni, u l-iżball standard għall-istima tal-parametru individwali (eż. il-pendil, l-interċetta);

— il-valuri NOEC (u LOEC) jekk jiġu kkalkolati;

— deskrizzjoni tal-proċeduri statistiki u l-preżunzjonijiet użati;

— wiri grafiku ta' din id-dejta u r-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons tal-ispeċijiet ittestjati.

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenzi matul it-test.

DOKUMENTAZZJONI

(1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzensc-hutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Kapitolu C.33 ta' dan l-Anness: Test tar-Riproduzzjoni tal-Ħniex (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Ingredjent attiv (a.i.) (jew sustanza attiva (a.s.)) huwa materjal imfassal biex jipprovdi effett bijoloġiku speċifiku (eż. kontroll tal-insetti, kontroll tal-mard tal-pjanti, kontroll tax-xibt fl-erja tat-trattament), magħruf ukoll bħala l-ingredjent attiv tal-grad tekniku, sustanza attiva.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti (CPPs jew PPPs) jew pestiċidi huma materjali b'attività bijoloġika speċifika użati b'mod maħsub biex jipproteġu l-pjanti minn pesti (eż. mard fungali, insetti u pjanti kompetittivi).

EC_x. Konċentrazzjoni tal-Effett ta'x % jew ER_x. Rata tal-Effett ta' x % hija l-konċentrazzjoni jew ir-rata li tirriżulta f'bidla mhux mixtieqa ta' x % fil-punt tat-tmiem finali tat-test li jitkejjel b'mod relattiv għall-kontroll (eż. 25 % jew 50 % tnaqqis fit-tfaċċar ta' nebbiet, piż tan-nebbiet, numru finali ta' pjanti preżenti, jew żieda fid-dannu viżwali jikkostitwixxi EC_{25}/ER_{25} jew EC_{50}/ER_{50} rispettivament).

Tfaċċar hija d-dehra ta' koleottilu jew kotiledon fuq wiċċ il-ħamrija.

Formulazzjoni hija l-prodott formulat kommerċjalment li fih is-sustanza attiva (ingredjent attiv), magħrufa wkoll bħala l-preparazzjoni finali [1] jew prodott għall-użu finali (TEP) tipiku.

LOEC (Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn ġie osservat effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal-LOEC, għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll, u hija ogħla mill-valur NOEC.

Pjanti mhux fil-mira: Dawk il-pjanti li mhumiex fl-erja tal-pjanti fil-mira. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, dan ġeneralment jirreferi għall-pjanti li ma jagħmlux parti mill-erja tat-trattament.

NOEC (Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn ma ġie osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Fitotossiċità: Devjazzjonijiet detrimentali (b'valutazzjonijiet imkejla u viżwali) mill-mudell normali ta' dehra u tkabbir ta' pjanti b'rispons għal sustanza kimika partikolari.

Replikat huwa l-unità sperimentali li tirrappreżenta l-grupp ta' kontroll u/jew il-grupp ta' trattament. F'dawn l-istudji, il-kontenitur huwa ddefinit bħala r-replikat.

Valutazzjoni viżwali: Klassifikazzjoni tad-dannu viżwali abbażi tal-osservazzjonijiet tal-istand tal-pjanta, il-vigor, il-malformazzjoni, il-kloroži, in-nekroži, u dehra ġenerali wara paragun ma' kontroll.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata matul dan il-metodu ta' ttestjar.

[1] Preparazzjoni Finali: Il-prodott formulat li fih is-sustanza attiva (ingredjent attiv) mibjugħ fis-suq.

▼**M6**

Appendiċi 2

Lista ta' speċijiet storikament użati fl-ittestjar tal-pjanti

Familja	Speċi	Ismijiet komuni
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Karrotti
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Ġirasol
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Ħassa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Mustarda Bajda
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Kaboċċa ċiniża
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Kolza
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Kaboċċa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Nevew
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Krexxuni tal-ġnien
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Ravanell
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Pitravi
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Ħjara
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Fażola tas-sojja
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Fażola mung
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Dwarf bean, Fażola Franċiża, Fażola tal-ġnien
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Piżelli
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Żerriegħa tal-fienu
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Qrempuċ tal-mogħoż
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Silla Ħamra
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Ġulbiena
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Kittien
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Qamħ saraċin
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Tadam

▼**M6**

Familja	Speċi	Ismijiet komuni
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amarylladaceae)	*Allium cepa*	Basal
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Ħafur
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Xgħir
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Sikran perenni
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Ross
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Segala
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Grain sorghum, Shattercane
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Qamħ
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Qamħirrum

▼M6

Appendiċi 3

Lista ta' speċijiet li potenzjalment mhumiex pjanti

Speċijiet Potenzjali tal-OECD għall-Ittestjar tat-Tossiċità tal-Pjanti.

Nota: It-tabella li ġejja tipprovdi informazzjoni għal 52 speċi li mhumiex pjanti (jingħataw referenzi fil-parenteżi għal kull entrata). Ir-rati ta' tfaċċjaw pprovduti huma minn dokumentazzjoni ppubblikata u huma għal gwida ġenerali biss. L-esperjenza individwali tista' tiddependi skont is-sors taż-żerriegħa u fatturi oħra.

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
APIACEAE *Torilis japónica* (Tursin tas-Sġajra Ġappuniża)	A, B żoni disturbati, ringieli ta' sġajriet, mergħat(16, 19)	1,7-1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratifikazzjoni bil-kesħa (7, 14, 18, 19) jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 19) l-ebda trattament speċjali (5)	WARA (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (Lellux Ingliż)	P bur, għelieqi li jinħartu, terf (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	il-ġerminazzjoni mhijiex affettwata mill-irradjanza(18, 19) l-ebda trattament speċjali (4, 14)	WARA (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (Wardet il-Qamħ)	A għelieqi, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	l-ebda trattament speċjali (2, 4)	WARA (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (Ċentawrja Sewda)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (18, 19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (19) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 26)	WARA (5, 22, 26)	A	
Inula h elenium Elecampane	P siti disturbati, umdi (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	A, F	

02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 2040

▼M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
Leontodon hispidus (Sinnet il-Ljun)	P ġħelieqi, ġniebi tat-toroq, żoni disturbati (16, 19)	0,85-1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (17, 18, 19) l-ebda trattament speċjali (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Black-eyed Susan)	B, P disturbata (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	l-ebda trattament speċjali (4, 14, 33)	WARA (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis Virga tad-Deheb Kanadiża	P mergħa, żoni miftuħa (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	ħallat b'parti ugwali ta' ramel u xarrab f'500 ppm għal 24 siegħa (11) l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (Agrimonja Komuni)	A ġħelieqi, ħabitats miftuħa (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		ġerminazzjoni tista' tiġi inibita mid-dlam (1) xarrab f'ilma sħun għal 12-il siegħa (29)	QABEL U WARA (31)	A	
Xanthium spinosum (Agrimonja Spinuża)	A ħabitats miftuħa (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		brix (14) l-ebda trattament speċjali (6)	QABEL U WARA (6)	A	
Xanthium strumarium (Agrimonja Taljana)	A ġħelieqi, ħabitats miftuħa (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		l-ebda trattament speċjali (6, 14, 21)	QABEL U WARA (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (Kardamina)	P ġħelieqi, ġniebi tat-toroq, terf (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22)	WARA (5, 22)	F	

▼M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja (1) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir (2)	Fond tat-Taħwil (mm) (3)	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) (4)	L-ebda trattament speċjali (5)	Test tat-Tossiċità (6)	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati (7)	Referenzi oħrajn (8)
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (Fjur Kukulu)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (18) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 15, 22-26)	WARA (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (Tiġieġa Ħoxna)	A marġini tal-għelieqi, żoni disturbati (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	it-trattament huwa differenti skont il-kulur taż-żerriegħa (19) irqad fi ħżien xott (19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 18, 19) stratifikazzjoni bil-kesħa (18) l-ebda trattament speċjali (14, 34)	QABEL U WARA (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (Fexfiex Komuni)	P għelieqi, art li tinħarat, ħabitats miftuħa (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 18, 19) l-ebda trattament (5, 14, 15, 25, 27)	WARA (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (Ipomea Vjola)	A ġnieb tat-toroq, ħabitats miftuħa, għelieqi tal-qamħirrum (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (6, 21)	QABEL U WARA (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (Nutsedge Vjola)	P art li tinħarat, mergħat, ġnieb tat-toroq (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (6, 10, 14)	QABEL U WARA (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (Għantqux)	P għelieqi bil-ħaxix, ġnieb tat-toroq, ħabitats miftuħa (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	brix (14, 19) il-ġerminazzjoni mhijiex affettwata mill-irradjanza (18, 19) l-ebda trattament speċjali (23, 25)	WARA (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja (1) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir (2)	Fond tat-Taħwil (mm) (3)	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) (4)	L-ebda trattament speċjali (5)	Test tat-Tossiċità (6)	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati (7)	Referenzi oħrajn (8)
Senna obtusifolia (Kassja, Sicklepod)	A boskijiet umdi (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		xarrab iż-żrieragħ fl-ilma għal 24 siegħa (9) brix (14) il-vijabbiltà taż-żerriegħa hija differenti skont il-kulur (1) l-ebda trattament speċjali (6)	WARA (6,9)	A	
Sesbania exaltata (Qanneb)	A ħamrija alluvjali (16)	11–13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		xarrab iż-żrieragħ fl-ilma għal 24 siegħa (9) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (21)	QABEL U WARA (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (Xnien Aħmar)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, art li tinħarat (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	brix (14, 18) jaf tkun teħtieġ maturazzjoni (19) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1, 19) l-ebda trattament speċjali (5)	WARA (5)	A, E, F	
LAM IAC E AE *Leonurus cardiaca* (Motherwort)	P żoni miftuħa (16)	0,75–1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		l-ebda trattament speċjali (4, 14)	WARA (4)	F	
Mentha spicata (Nagħniegħ)	P żoni umdi (16)	2,21 (4)		0 (4)		l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	F	
Nepeta cataria (Ħaxixet il-Qtates)	P erjas disturbati (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		l-ebda trattament speċjali (2, 4, 14)	WARA (2,4)	F	

▼M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja (1) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir (2)	Fond tat-Taħwil (mm) (3)	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) (4)	L-ebda trattament speċjali (5)	Test tat-Tossiċità (6)	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati (7)	Referenzi oħrajn (8)
Prunella vulgaris (Prunella)	P ġħelieqi li jinħartu, żoni bil-ħaxix, siti disturbati (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) ġerminazzjoni ikbar b'żrieragħ ikbar (1) l-ebda trattament speċjali (4, 14, 22)	WARA (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (Ħurrieq irqiq)	P mergħat, marġini tal-ġħelieqi (19)	14–18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22)	WARA (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Werqa bellusija)	A ġħelieqi, ħabitats miftuħa (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	brix (14) l-ebda trattament (5, 10, 21)	QABEL U WARA (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (Prickly Sida)	A ġħelieqi, ġniebi tat-toroq (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		brix (14) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (6, 21)	QABEL U WARA (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (Peprin)	A ġħelieqi, art li tinħarat, siti miftuħa (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratifikazzjoni bil-kesħa u brix (1, 19, 32) l-ebda trattament (4, 14, 29)	WARA (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (Agrositis Komuni)	ħaxix, mergħat (16)	0,07 (14)	L > D (ĦO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 17-19) l-ebda trattament speċjali (10)	WARA (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (Denb il-Volpi)	A ġħelieqi, ħabitats miftuħa (16)	0,9–1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	brix (14) ittratta b'101 mg/L KNO3 (14) stratifikazzjoni bis-sħana (1) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (34)	QABEL U WARA (28, 34)	A	32

▼M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
Avena fatua (Ħafur Selvaġġ)	A żoni kkultivati, ħabitats miftuħa (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	brix (7, 32) id-dlam jinibixxi l-ġerminazzjoni (1) brix bil-kesħa (1, 18) l-ebda trattament speċjali (6, 10, 14)	QABEL U WARA (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Bunixxief)	A għelieqi, ġniebi tat-toroq, art li tinħarat (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		perjodu ta' maturazzjoni (1, 7, 32) ġerminazzjoni inibita mid-dawl (1) l-ebda trattament speċjali (14)	QABEL U WARA (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Ħaxix Denb il-Kelb)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	ġerminazzjoni mhux affettwat mill-irradjanza (19) l-ebda trattament speċjali (14, 29)	WARA (5)	A	
Digitaria sanguinalis (Diġitarja)	A għelieqi, terf, ħabitats miftuħa (16)	0,52–0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	brix, stratifikazzjoni bil-kesħa, u maturazzjoni (1, 7, 14, 32) ittratta b'101 mg/L KNO3 (14) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (21)	QABEL U WARA (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Ħaxix tar-Razzett)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		brix (7, 32) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (3, 14, 21)	QABEL U WARA (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Segala Selvaġġa Kanadiża)	P riparjani, siti disturbati (16)	4–5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	l-ebda trattament speċjali (2, 11)	WARA (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (Żwien)	P għelieqi, żoni umdi (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	l-ebda trattament speċjali (10, 19)	WARA (10)	A	7

▼M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
Hordeum pusillum (Xgħir Żgħir)	A mergħat, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16)	3,28 (14)				stratifikazzjoni bis-sħana (1) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1)	QABEL (31)		7
Phieum pratense (Ħaxix tal-Għalf)	P mergħat, għelieqi li jinħartu, siti disturbati (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (19) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (17) l-ebda trattament speċjali (10, 14, 17, 19)	WARA (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (Leblieba Ħadra)	A ħabitats miftuħa, ġnub tat-toroq (16)	5–8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		stratifikazzjoni bil-kesħa għal 4 — 8 ġimgħat (1, 2, 4, 20, 29) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1)	QABEL U WARA 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (Persikarja)	A ħamrija umda (16)	1,8–2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18) statifikazzjoni bil-kesħa (1) l-ebda trattament speċjali (5)	QABEL U WARA (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (Pennsylvania Smartweed)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		stratifkazzjoni bil-kesħa għal 4 ġimgħat f'0 — 5oC (1, 29) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1)	QABEL (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Smartweed)	A żoni disturbati, art li tinħarat (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	brix, stratifikazzjoni bil-kesħa, trattament GA (14) stratifikazzjoni bil-kesħa, maturazzjoni (17-19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (19) l-ebda trattament speċjali (13)	WARA (13)	A	32

▼M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja (1) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir (2)	Fond tat-Taħwil (mm) (3)	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) (4)	L-ebda trattament speċjali (5)	Test tat-Tossiċità (6)	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati (7)	Referenzi oħrajn (8)
Rumex crispus (Qarsajja Nnuklata)	P ġħelieqi li jinħartu, ġniebi tat-toroq, żoni miftuħa (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (18) l-ebda trattament speċjali (4, 14, 33)	WARA (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (Ħarira Ħamra)	A ġħelieqi li jinħartu, żoni miftuħa, siti disturbati (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	stratifikazzjoni bil-kesħa, trattament GA (1, 14, 18, 19, 32) dawl meħtieġ għall- ġerminazzjoni (1) l-ebda trattament speċjali (2, 4)	WARA (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (Qarsu Komuni)	P ġħelieqi li jinħartu, ġniebi tat-toroq, żoni miftuħa (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 24 -26)	WARA (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (Ġeum Isfar)	P ringieli ta' sġajriet, żoni umdi (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) stratifikazzjoni bis-sħana (1) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 25, 26)	WARA (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (Ħarxaja Komuni)	A ġħelieqi li jinħartu, żoni umdi, siti disturbat (16, 19)	7–9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratifazzjoni bil-kesħa (1, 18, 19) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (18, 19) id-dawl jinibixxi l-ġerminazzjoni (1) l-ebda trattament speċjali (6, 14)	QABEL U WARA (6, 28)	A	32

▼M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
Galium mollugo (Ħarxajja tal-Kannizzati)	P sisien tal-ħaxix, żoni miftuħa (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 24, 26, 29)	WARA (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (Diġitalis)	sisien tal-ħitan B,P, żoni miftuħa (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 17-19) l-ebda trattament speċjali (4, 22-26)	WARA (4, 22, 26)	D, G, F	
Veronika persica (Veronika)	A għelieqi li jinħartu, żoni miftuħa, siti disturbati (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) stratifikazzjoni bil-kesħa (18) l-ebda trattament speċjali (14)	QABEL U WARA (28)	A	32

([1]) A = Pjanti annwali, B = Pjanti biennali, P = Pjanti perenni.
([2]) Referenzi 11,14 u 33 jirreferu għall-proporzjon ta' dawl (L) u dlam (D) meħtieġ biex tiġi indotta ġerminazzjoni taż-żerriegħa. Referenzi 3, 6, 9, 10, 13, 20 jirreferu għalkundizzjonijiet ta' tkabbir fis-serer.
([3]) 0 mm jindika li ż-żerriegħa nżergħu fuq wiċċ il-ħamrija jew li ż-żerriegħa jeħtieġu d-dawl biex jiġġerminaw.
([4]) In-numri pprovduti jirrappreżentaw in-numru ta' jiem fejn perċentwal ta' żrieragħ iġġerminati skont ir-referenza pprovduta, eż. 3 ijiem (50 %) ġerminazzjoni (referenza19).
([5]) It-tul ta' maturazzjoni u jew is-stratifikazzjoni mhumiex dejjem disponibbli. Ħlief għar-rekwiżiti tat-trattament bil-kesħa, il-kundizzjonijiet tat-temperatura mhumiex speċifikati peress li fl-ittestjar tas-serer hemm kontroll ta' temperatura limitata. Il-biċċa l-kbira taż-żrieragħ sejrin jiġġerminaw f'varjazzjoni normali tat-temperaturi misjuba fis-serer.
([6]) Tindika speċi li kienet utilizzata f'test tat-tossiċità tal-pjanta qabel it-tfaċċar (QABEL) u/jew wara t-tfaċċar (WARA) li jinvolvi erbiċidi.
([7]) Tipprovdi eżempju/eżempji ta' forniturі ta' żrieragħ kummerċjali.
([8]) Tipprovdi żewġ referenzi alternattivi li ġew ikkonsultati.

▼M6

Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati

ID tal-Fornitur	Informazzjoni dwar il-Fornitur
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344 — 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 — 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 — 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873 — 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274-7333 www.thompson-morgan.com

REFERENZI ĊĊITATI

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 — 208.

▼M6

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. pp. 151 — 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

Appendiċi 4

Eżempji għal kundizzjonijiet ta' tkabbir xierqa għal ċerti speċijiet ta' pjanti

Il-kundizzjonijiet li ġejjin instabu li huma xierqa għal 10 speċijiet ta' pjanti, u jistgħu jintużaw bħala gwida għal testijiet f'ċerti kompartimenti ta' tkabbir b'ċerti speċijiet oħra wkoll:

Konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju: 350 ± 50 ppm;

Umdità relattiva: 70 ± 5 % matul perjodi ta' dawl u 90 ± 5 % matul perjodi fid-dlam;

Temperatura: 25 ± 3 °C matul il-jum, 20 ± 3 °C matul il-lejl;

Fotoperjodu: 16-il siegħa dawl /8 sigħat dlam, meta wieħed jassimi tul ta' mewġa medja ta' 400 sa 700 nm;

Dawl: luminanza ta' 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, imkejla fil-parti ta' fuq tal-kopertura.

L-ispeċijiet ta' pjanti huma:

— tadam (*Solanum lycopersicon*);

— ħjar (*Cucumis sativus*);

— ħass (*Lactuca sativa*);

— fażola tas-sojja (*Glycine max*);

— kaboċċi (*Brassica oleracea* var. *capitata*);

— zunnarija (*Daucus carota*);

— ħafur (*Avena sativa*);

— sikrana perenni (*Lolium perenne*);

— qamħirrum (*Zea mays*);

— basla (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ENCHYTRAEID

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar tal-OECD (TG) 220 (2004). Huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-produzzjoni riproduttiva tad-dudu enchytraeid, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, fil-ħamrija. Huwa bbażat prinċipalment fuq metodu żviluppat minn Umweltbundesamt, il-Ġermanja (1) li sarlu ring test (2). Ġew ikkunsidrati wkoll metodi oħra għall-ittestjar tat-tossiċità tas-sustanzi kimiċi għal Enchytraeidae u l-ħniex (3)(4)(5)(6)(7)(8).

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

2. L-annelidi li jgħixu fil-ħamrija tal-ġeneru Enchytraeus huma speċijiet ekoloġikament rilevanti għall-ittestjar ekotossikoloġiku. Filwaqt li l-enchytraeids, ħafna drabi jinstabu fil-ħamriji li fihom il-ħniex, huwa veru wkoll li ħafna drabi huma abundanti f'diversi ħamriji fejn ma jinstabux il-ħniex. Enchytraeids jistgħu jintużaw f'testijiet tal-laboratorju kif ukoll fi studji prattiċi u semiprattiċi. Minn perspettiva prattika, ħafna speċijiet ta' Enchytraeus huma faċli biex jiġu mmaniġġati u jitnisslu, u ż-żmien għall-ġenerazzjoni tagħhom huwa ferm iqsar milli għall-ħniex. It-tul għal test tar-riproduzzjoni b'enchytraeids huwa għalhekk biss 4-6 ġimgħat filwaqt li għall-ħniex (Eisenia fetida) huwa ta' 8 ġimgħat.

3. Informazzjoni bażika dwar l-ekoloġija u l-ekotossikoloġija ta' enchytraeids fl-ambjent terrestri tista' tinstab f'(9)(10)(11)(12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

4. Il-ħniex enchytraeid adulti huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallta ma' ħamrija artifiċjali. It-test jista' jinqasam f'żewġ stadji: (a) test tas-sejba tal-medda, f'każ li tkun disponibbli biżżejjed informazzjoni, fejn il-mortalità hija l-punt ta' tmiem ivvalutata wara espożizzjoni ta' ġimagħtejn u (b) test tar-riproduzzjoni finali fejn huwa vvalutat in-numru totali ta' frieħ prodotti mill-annimal ġenitur u s-sopravivenza tal-annimali ġenituri. It-tul tat-test finali huwa sitt ġimgħat. Wara l-ewwel tliet ġimgħat, id-dud adult jitneħħa u jiġu rreġistrati l-bidliet morfoloġiċi. Wara tliet ġimgħat oħra, jingħadd in-numru ta' frieħ, imfaqqsa mill-fosdqiet prodotti mill-adulti. Il-prodozzjoni riproduttiva tal-annimali esposti għas-sustanza kimika tat-test titqabbel ma' dik tal-kontroll(i) sabiex tiġi ddeterminata (i) il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) u/jew (ii) EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) permezz ta' mudell ta' rigressjoni biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża tnaqqis ta' x % fil-produzzjoni riproduttiva. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom jibbrakitjaw l-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) biex b'hekk l-EC_x imbagħad joħroġ mill-interpolazzjoni iktar milli l-estrapolazzjoni.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

5. Is-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma tal-ħamrija (eż. Kapitolu C.18 jew C.19 ta' dan l-Anness) u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test għandhom preferibbilment ikunu magħrufa. Hija rakkomandabbli informazzjoni addizzjonali dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija, bħar-rati ta' fotolisi u idrolisi.

6. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża għal sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. Madankollu, il-mod ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ser ivarja kif xieraq. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent ta' partizzjoni arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

▼M6

VALIDITÀ TAT-TEST

7. Sabiex it-test ikun validu, għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin fil-kontrolli:

— il-mortalità tal-adulti ma għandhiex taqbeż l-20 % fi tmiem it-test tas-sejba tal-medda u wara l-ewwel tliet ġimgħat tat-test tar-riproduzzjoni.

— jekk wieħed jassumi li ntużaw 10 adulti f'kull reċipjent fil-konfigurazzjoni tat-test, medja ta' mill-anqas 25 frieħ f'kull reċipjent kellha tiġi prodotta fi tmiem it-test.

— il-koeffiċjent ta' varjazzjoni madwar in-numru medju ta' frieħ għandu jkun ogħla minn 50 % fi tmiem it-test tar-riproduzzjoni.

Fejn test jonqos milli jissodisfa l-kriterji ta' validità ta' hawn fuq, it-test għandu jiġi tterminat sakemm ma tkunx tista' tiġi pprovduta ġustifikazzjoni biex isir it-test. Il-ġustifikazzjoni għandha tiġi inkluża fir-rapport tat-test.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

8. Sustanza kimika ta' referenza għandha tiġi ttestjata f'intervalli regolari jew possibbilment inkluża f'kull test biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organiżmi tat-test ma nbidilx wisq maż-żmien. Sustanza kimika ta' referenza xierqa hija karbendażim, li ntweriet li taffettwa s-sopravivenza u r-riproduzzjoni ta' enchytraeids (13)(14), jew jistgħu jintużaw ukoll sustanzi kimiċi oħra li d-dejta tat-tossiċità tagħhom hija magħrufa sew. Formulazzjoni ta' karbendażim magħrufa bl-isem kummerċjali ta' Derosal ™ fornita minn AgrEvo Company (Frankfurt, il-Ġermanja) u li fiha 360 g/l (32,18 %) ingredjent attiv intużat f'ring test (2). L-EC_{50} għar-riproduzzjoni ddeterminata fir-ring test kienet fil-medda ta' 1,2 ± 0,8 mg ingredjent attiv (a.i) /kg massa xotta (2). Jekk standard tat-tossiċità pożittiv huwa inkluż fis-serje tat-test, tintuża konċentrazzjoni waħda u n-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak fil-kontrolli. Għal karbendażim, huwa rakkomandat l-ittestjar ta' 1,2 mg a.i./kg piż xott (ittestjat bħala formulazzjoni likwida).

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Tagħmir

9. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu magħmula mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. Vażetti tal-ħġieġ (eż. volum: 0,20 — 0,25 litru; dijametru: ≈ 6 cm) huma xierqa. Ir-reċipjenti għandu jkollhom għotjien trasparenti (eż. ħġieġ jew polietilen) li huma ddisinjati biex inaqqsu l-evaporazzjoni tal-ilma filwaqt li jippermettu l-iskambju tal-gass bejn il-ħamrija u l-atmosfera. Dawn l-għotjien għandhom ikunu trasparenti biex jgħaddi d-dawl minnhom.

10. Huwa meħtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:

— armadju tat-tnixxif;

— sterjomikroskopju;

— miter tal-pH u fotometru;

— imwieżen preċiżi xierqa;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni jkollhom l-għotjien);

— inkubatur jew kamra żgħira b'arja kondizzjonata;

— pinzetti, ganċijiet jew ingassi;

— photo basin.

Preparazzjoni tal-ħamrija artifiċjali

11. F'dan it-test tintuża ħamrija artifiċjali (5)(7) bil-kompożizzjoni li ġejja (abbażi tal-piżijiet xotti, li titnixxef għal piż kostanti ta' 105 °C):

▼**M6**

— 10 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u miħun irqiq (daqs tal-frak ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli); huwa rakkomandat li jiġi vverifikat li ħamrija mħejjija b'lott ġdid ta' pit hija xieraqa għall-kulturi tad-dud qabel tintuża f'test;

— 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);

— madwar 0,3 sa 1,0 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$, polverizzat, grad analitiku) biex tinkiseb pH ta' 6,0 ± 0,5; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiżdied jiddependi l-iktar fuq il-kwalità/natura tal-pit;

— madwar 70 % ramel kwarzuż imnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron.

Huwa rakkomandabbli li tintwera l-adegwatezza ta' ħamrija artifiċjali għall-kulturi tad-dud u għall-ilħuq tal-kriterji tal-validità tal-ittestjar qabel tintuża l-ħamrija f'test finali. Huwa speċjalment rakkomandat li ssir tali verifika biex jiġi żgurat li l-prestazzjoni tat-test ma tkunx f'riskju jekk jitnaqqas il-kontenut ta' karbonju organiku tal-ħamrija artifiċjali, eż. billi jitnaqqas il-kontenut ta' pit għal 4-5 % u jiżdied il-kontenut ta' ramel kif xieraq. B'tali tnaqqis fil-kontenut tal-karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test mill-ħamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test għad-dud tista' tiżdied. Intwera li *Enchytraeus albidus* jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità dwar ir-riproduzzjoni meta jiġi ttestjat f'ħamrija tal-għelieqi b'kontenut ta' karbonju organiku iktar baxx milli ntqal hawn fuq (eż. 2,7 %) (15), u hemm esperjenza — għalkemm limitata — li dan jista' jintlaħaq ukoll f'ħamrija artifiċjali b'5 % pit.

Nota: Meta tintuża ħamrija naturali f'ittestjar (eż. ta' livell ogħla) addizzjonali, għandha tintwera ukoll l-adegwatezza tal-ħamrija u l-ilħuq tal-kriterji tal-validità tat-test.

12. Il-kostitwenti xotti tal-ħamrija jitħalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira). Dan għandu jsir tal-inqas darba f'ġimgħa qabel il-bidu tat-test. Il-ħamrija mħallta għandha tinħażen għal tal-inqas jumejn sabiex tiġi ekwilibrata/stabbilizzata l-aċidità. Għad-determinazzjoni tal-pH, tintuża taħlita ta' ħamrija u 1 M klorur tal-potassju (KCI) jew 0,01 M soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju ($CaCl_2$) f'proporzjon ta' 1:5 (ara (16) u Appendiċi 3). Jekk il-ħamrija hija iktar aċidika mill-medda meħtieġa (ara l-paragrafu 11), tista' tiġi aġġustata biż-żieda ta' ammont xieraq ta' $CaCO_3$. Jekk il-ħamrija hija alkalina wisq tista' tiġi aġġustata billi tiżdied iktar taħlita, li ssir referenza għaliha fil-paragrafu 11, iżda li teskludi s-$CaCO_3$.

13. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) massima tal-ħamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2. Jum jew jumejn qabel il-bidu tat-test, il-ħamrija artifiċjali xotta tixxarrab minn qabel billi jiżdied biżżejjed ilma mhux dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut finali tal-ilma, li huwa ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità massima ta' żamma tal-ilma. Fil-bidu tat-test, il-ħamrija mxarrba minn qabel tinqasam fi porzjonijiet li jikkorrispondu għan-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test (u s-sustanza kimika ta' referenza fejn ikun xieraq) u l-kontrolli użati għat-test.

▼M6

Il-kontenut ta' umditá huwa aġġustat għal 40-60 % tad-WHC massima biż-żieda tas-soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test u/jew biż-żieda ta' ilma distillat jew dejonizzat (ara l-paragrafi 19-21). Il-kontenut ta' umditá huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test (billi jitnixxef għal piż kostanti f'105°C) u għandu jkun fi ħdan l-aħjar medda għas-sopravivenza tad-dud. Verifika approssimattiva tal-kontenut ta' umditá fil-ħamrija tista' tinkiseb billi l-ħamrija tingħasar bil-mod fl-idejn, jekk il-kontenut ta' umditá jkun tajjeb, għandhom jidhru qtar żgħar tal-ilma bejn is-swaba.

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

14. L-ispeċi tal-ittestjar rakkomandata hija *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (potworm abjad), membru tal-familja *Enchytraeidae* (ordni *Oligochaeta*, phylum *Annelida*). *E. albidus* hija waħda mill-akbar speċijiet ta' enchytraeids, bir-reġistrazzjoni ta' kampjuni sa 35 mm f'tul (17)(18). *E. albidus* għandha distribuzzjoni dinjija u tinstab fil-ħabitats tal-baħar, tal-ilma ħelu u terrestri, prinċipalment f'materja organika li tkun qiegħda titmermer (makroalgi tal-baħar, kompost) u rarament f'mergħat (9). It-tolleranza ekoloġika wiesgħa tagħha u xi varjazzjonijiet morfoloġiċi jaf jindikaw li jeżistu razez differenti.

15. *E. albidus* hija kummerċjalment disponibbli, bħala ikel għall-ħut. Għandu jiġi vverifikat jekk il-kultura hijiex kontaminata minn speċijiet oħrajn, ġeneralment iżgħar (1) (19). Jekk ikun hemm kontaminazzjoni, id-dud kollu għandu jitlaħlaħ bl-ilma f'dixx petri. Imbagħad għandhom jintgħażlu kampjuni ta' adulti kbar ta' *E. albidus* (permezz ta' sterjomikroskopju) biex tinbeda kultura ġdida u d-dud l-ieħor kollu jintrema. *E. albidus* tista' titrabba faċilment f'firxa wiesgħa ta' materjali organiċi (ara l-Appendiċi 4). Iċ-ċiklu tal-ħajja ta' *E. albidus* huwa qasir peress li tilħaq il-maturità bejn it-33 jum (f'18 °C) u l-74 jum (f'12 °C) (1). Għat-test sejrin jintużaw biss dawk il-kulturi li nżammu mingħajr problemi fil-laboratorju għal tal-inqas 5 ġimgħat (ġenerazzjoni waħda).

16. Huma xierqa wkoll speċijiet oħra tal-ġeneru *Enchytraeus*, pereżemju *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 jew *E. crypticus* Westheide u Graefe 1992 (ara l-Appendiċi 5). Jekk jintużaw speċijiet oħra ta' *Enchytraeus*, dawn għandhom jiġu identifikati b'mod ċar u għandu jiġi rrapportat ir-raġunament wara l-għażla tal-ispeċijiet.

17. L-annimali użati fit-testijiet huma dud adult. Dawn għandu jkollhom bajd (tikek bojod) fir-reġjun tal-klitellu, u għandhom ikollhom bejn wieħed u ieħor l-istess daqs (tul ta' madwar 1 cm). Mhijiex meħtieġa sinkronizzazzjoni tal-kultura tat-tnissil.

18. Jekk l-enchytraeids ma jitnisslux fl-istess tip ta' ħamrija u fl-istess kundizzjonijiet (inkluż it-tagħlif) użati għat-test finali, dawn għandhom jiġu akklimatizzati għal tal-inqas 24 siegħa u sa tliet ijiem. Inizjalment għandu jiġi akklimatizzat numru kbir ta' adulti minn dawk meħtieġa għat-twettiq tat-test biex ikun hemm skop għar-rifjut tal-kampjuni danneġġati jew inkella mhux adattati. Fi tmiem il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, jintgħażel biss id-dud li fih il-bajd u li ma jesebixxi ebda anormalità fl-imġiba (eż. jipprova jaħrab mill-ħamrija) għat-test. Id-dud jitneħħa b'attenzjoni permezz ta' pinzetti, ganċijiet jew ħoloq tal-ġojjellier u jitqiegħed f'dixx petri li jkun fih ammont żgħir ta' ilma ħelu. Ilma frisk rikostitwit kif propost fil-Kapitolu C.20 ta' dan l-Anness (Test tar-Riproduzzjoni *Daphnia magna*) huwa preferut għal dan il-fini peress li ilma tal-vit dejonizzat u demineralizzat jaf ikun ta' ħsara għad-dud. Id-dud jiġu spezzjonati taħt sterjomikroskopju u dak li ma jkollux bajd jintrema. Kwalunkwe dud irqiq jew springtail li jaf infetta l-kulturi jitneħħa jew jintrema b'attenzjoni. Dud b'saħħtu li ma jintużax għat-test jerġa' jitpoġġa' fil-kultura ewlenija.

▼M6

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

19. Tiġi ppreparata soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'ilma dejonizzat f'kwantità suffiċjenti għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni tat-test waħda. Huwa rakkomandat li tintuża kwantità xierqa ta' ilma biex jintlaħaq il-kontenut ta' umdità meħtieġ, jiġifieri 40 sa 60 % tad-WHC massima (ara l-paragrafu 13). Kull soluzzjoni ta' sustanza kimika tat-test titħawwad sew b'lott wieħed ta' ħamrija mxarrba minn qabel, qabel tiġi introdotta fir-reċipjent tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

20. Għal sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma iżda li jinħallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinħall fl-iżgħar volum possibbli ta' veikolu xieraq (eż. aċetun). Għandhom jintużaw biss solventi volatili. Il-veikolu jiġi sprejat fuq jew jitħallat b'ammont żgħir, pereżempju 2,5 g, ta' ramel kwarzuż irqiq. Il-veikolu huwa eliminat bl-evaporazzjoni taħt għata tad-dħaħen għal tal-inqas siegħa. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' ħamrija mxarrba minn qabel u titħallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex tinkiseb l-umdità meħtieġa. It-taħlita finali tiġi introdotta fir-reċipjenti tat-test.

21. Għal sustanzi kimiċi li ma tantx jinħallu fl-ilma u solventi organiċi, l-ekwivalent ta' 2,5 g ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq f'kull reċipjent tat-test jitħallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni tat-test mixtieqa. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' ħamrija mxarrba minn qabel u titħallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut ta' umdità meħtieġ. It-taħlita finali tinqasam bejn ir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jiġi ppreparat ukoll kontroll xieraq.

22. Is-sustanzi kimiċi għandhom normalment jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet ogħla minn 1 000 mg/kg massa ta' ħamrija. Madankollu jaf ikun meħtieġ ittestjar f'konċentrazzjonijiet ogħla skont l-objettivi ta' test speċifiku.

EŻEKUZZJONI TAT-TESTIJIET

Gruppi tal-ittestjar u kontrolli

23. Għal kull konċentrazzjoni tat-test, jitqiegħed ammont ta' ħamrija tat-test korrispondenti għal 20 g piż xott fir-reċipjenti tat-test (ara l-paragrafi 19-21). Jiġu ppreparati wkoll kontrolli, mingħajr is-sustanza kimika tat-test. L-ikel jiżdied ma' kull reċipjent skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafu 29. Għaxar dud jiġu allokati b'mod każwali f'kull reċipjent tat-test. Id-dud jiġi ttrasferit b'attenzjoni f'kull reċipjent tat-test u jitqiegħed f'wiċċ il-ħamrija permezz ta' pereżempju, pinzetti, ganċijiet jew ħoloq tal-ġojjellier. In-numru ta' repliki għal konċentrazzjonijiet tat-test u għall-kontrolli jiddependi fuq id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafu 34). Ir-reċipjenti tat-test jitqiegħdu b'mod każwali fl-inkubatur tat-test u dawn il-pożizzjonijiet jiġu randomizzati mill-ġdid kull ġimgħa.

24. Jekk għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jintuża veikolu, għandha ssir serje ta' kontrolli waħda li fiha ramel kwarzuż isprejjat jew imħallat b'solvent minbarra s-serje tal-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' solvent jew aġent dispersiv għandha tkun l-istess bħal dik użata fir-reċipjenti tat-test li fihom is-sustanza kimika tat-test. Għandha ssir serje ta' kontrolli li fiha ramel kwarzuż addizzjonali (2,5 g f'kull reċipjent) għal sustanzi kimiċi li jeħtieġu li jingħataw skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafu 21.

▼M6

Kundizzjonijiet tat-test

25. It-temperatura tat-test hija 20 ± 2 °C. Biex id-dud jiġi skorraġġit milli joħroġ mill-ħamrija, it-test isir f'ċikli ta' dawl u dlam ikkontrollati (idealment 16-il siegħa dawl u 8 sigħat dlam) b'illuminazzjoni ta' bejn 400 u 800 lux fiż-żona tar-reċipjenti tat-test.

26. Sabiex tiġi ċċekkjata l-umdità tal-ħamrija, ir-reċipjenti jintiżnu fil-bidu tat-test u minn hemm 'il quddiem darba f'ġimgħa. Iż-żieda ta' ammont xieraq ta' ilma dejonizzat tagħmel tajjeb għat-telf tal-piż. Ta' min jgħid li t-telf tal-ilma jista' jitnaqqas biż-żamma ta' umdità għolja tal-arja (> 80 %) fl-inkubatur tat-test.

27. Il-kontenut ta' umdità u l-pH għandhom jitkejlu fil-bidu u fi tmiem it-test tas-sejba tal-medda u t-test finali. Il-kejliet għandhom isiru f'kontroll u fil-kampjuni tal-ħamrija tal-kontroll u ttrattati (il-konċentrazzjonijiet kollha) imħejjin u miżmuma fl-istess mod bħall-kulturi tat-test iżda mingħajr dud. L-ikel għandu jiżdied ma' dawn il-kampjuni tal-ħamrija fil-bidu tat-test biex jiffaċilita l-attività mikrobjali. L-ammont ta' ikel miżjud għandu jkun l-istess bħal dak miżjud mal-kulturi tat-test. Mhuwiex meħtieġ li żżid iktar ikel ma' dawn ir-reċipjenti matul it-test.

Tagħlif

28. Jista' jintuża ikel li bih tkun tista' tgħħix popolazzjoni ta' enchytraeids. Ħafur irrumblat, preferibbilment mgħoddi minn awtoklavi qabel l-użu biex tevita l-kontaminazzjoni b'mikrobi (tiswin huwa xieraq ukoll), instab li huwa materjal ta' tagħlif xieraq.

29. L-ikel l-ewwel jiġi pprovdut billi jitħalltu 50 mg ħafur irrumblat tal-art mal-ħamrija f'kull reċipjent qabel ma jiddaħħal id-dud. Għalhekk, l-ikel huwa fornit kull ġimgħa sal-21 Jum. It-tagħlif ma jsirx fit-28 Jum peress li l-adulti jkunu tneħħew f'dan l-istadju u l-frieħ tad-dud jeħtieġu relattivament ftit ikel addizzjonali lil hinn dan il-punt. It-tagħlif matul it-test jinkludi 25 mg ħafur irrumblat irqiq għal kull reċipjent mqiegħed b'attenzjoni fuq wiċċ il-ħamrija biex b'hekk jiġi evitat li d-dud iweġġa'. Sabiex jitnaqqas it-tkabbir fungali, il-qxur tal-ħafur għandhom jinżergħu fil-ħamrija billi jiġu koperti b'ammonti żgħar ta' ħamrija. Jekk l-ikel jibqa' ma jittikilx, il-proporzjon għandu jitnaqqas.

Disinn għat-test tas-sejba tal-medda

30. Meta jkun meħtieġ, test tas-sejba tal-medda jitwettaq pereżempju b'ħames konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg (piż xott tal-ħamrija). Replikat wieħed għal kull trattament u kontroll huwa suffiċjenti.

31. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda hija ġimagħtejn. Fi tmiem it-test, tiġi vvalutata l-mortalità tad-dud. Dudu huwa rreġistrat bħala mejjet jekk ma jkollu ebda reazzjoni bħala stimulu mekkaniku fil-parti anterjuri. Informazzjoni addizzjonali għall-mortalità jaf ukoll tkun utli biex tittieħed deċiżjoni dwar il-medda ta' konċentrazzjonijiet li għandha tintuża fit-test finali. Il-bidliet fl-imġiba tal-adulti (eż. l-inabbiltà biex titħaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjħu mal-ħajt tal-ħġieġ tar-reċipjent tat-test) u l-morfoloġija (eż.l-preżenza ta' feriti miftuħa) għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieħ. Dan tal-aħħar jista' jiġi ddeterminat permezz tal-metodu ta' tilwin deskritt fl-Appendiċi 6.

32. L-LC_{50} jista' jiġi ddeterminat bejn wieħed u ieħor billi tiġi kkalkolata l-medja ġeometrika tad-dejta tal-mortalità. Fl-istabbilment tal-medda ta' konċentrazzjoni għat-test finali, wieħed jassumi li l-effetti huma inqas mil-LC_{50} b'fattur sa 10 darbiet. Madankollu, din hija relazzjoni empirika u fi

▼M6

kwalunkwe każ speċifiku jaf tkun differenti. Osservazzjonijiet addizzjonali li saru fit-test tas-sejba tal-medda bħall-okkorrenza tal-frieħ jistgħu jgħinu biex jirfinaw il-medda tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tintuża għat-test finali.

33. Sabiex ikun hemm determinazzjoni preċiża tal-LC_{50}, huwa rakkomandat li t-test jitwettaq b'tal-anqas erba' repliki tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u numru adegwat tal-konċentrazzjonijiet biex jiġu kkawżati tal-inqas erba' risponsi medji differenti statistikament sinifikanti f'dawn il-konċentrazzjonijiet. Numru simili ta' konċentrazzjonijiet u repliki għall-kontrolli jintużaw meta jkunu applikabbli.

Disinn għat-test tar-riproduzzjoni finali

34. Huma proposti tliet disinji abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test (2)

— Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 1,8.

— Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}), għandhom jiġu ttestjati ħames konċentrazzjonijiet u l-konċentrazzjonijiet għandhom jibbrakitjaw f'EC_x sabiex jippermettu l-interpolazzjoni ta' EC_x u mhux estrapolazzjoni. Tal-inqas erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test u erba' repliki ta' kontroll huma rakkomandati. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugwali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet.

— Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal-EC_x. Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx il-1,8.

35. Għandhom jintużaw għaxar dud adulti għal kull reċipjent tat-test (ara l-paragrafu 23). L-ikel jiżdied mar-reċipjenti fil-bidu tat-test u mbagħad darba f'ġimgħa (ara paragrafu 29) sal-21 Jum. Fil-21 Jum, il-kampjuni tal-ħamrija ssirihom tfittixija bir-reqqa bl-idejn u d-dud adulti ħajjin jiġu osservati u jingħaddu u jiġu rreġistrati l-bidliet fl-imġiba (eż. inabbiltà li titħaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjħu mal-ħajt tal-ħġieġ tar-reċipjent tat-test) u fil-morfoloġija (eż. feriti miftuħa). Id-dud adult mbagħad jitneħħa mir-reċipjenti tat-test u l-ħamrija tat-test. Il-ħamrija tal-ittestjar li fiha kwalunkwe fosdqa li kienu prodotti huma inkubati għal tliet ġimgħat addizzjonali taħt l-istess kundizzjonijiet tat-test ħlief dik li t-tagħlif iseħħ biss fil-Jum 35 (jiġifieri 25 mg ħafur tal-art irrumblat għal kull reċipjent).

36. Wara sitt ġimgħat, jingħadd id-dud li għadu kif faqqas. Il-metodu bbażat fuq tbajja ħomor ta' Bengal (ara l-Appendiċi 6) huwa rakkomandat għalkemm estrazzjoni mxarrba oħra (iżda mhux bis-sħana) u metodi ta' żamma fil-wiċċ (ara l-Appendiċi 6) ipprovaw ukoll li huma xierqa (4)(10)(11)(20). Tbajja ħomor ta' Bengal huma rakkomandati peress li l-estrazzjoni mxarrba minn sottostrat tal-ħamrija tista' titfixkel minn turbidità kkawżata minn frak tat-tafal suspiżi.

Test tal-limitu

37. Jekk ma jkunu osservati ebda effetti fuq l-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jista' jitwettaq bħala test tal-limitu, permezz ta' 1 000 mg/kg sabiex jintwera li l-NOEC għar-riproduzzjoni huwa ikbar minn dan il-valur.

▼M6

Sommarju u skeda taż-żmien għat-test

38. Il-passi tat-test jistgħu jinġabru fil-qosor kif ġej:

Ħin	Test tas-sejba tal-medda	Test finali
Jum –7 jew iktar kmieni	— Ħejji l-ħamrija artifiċjali (taħlita ta' kostitwenti xotti)	— Ħejji l-ħamrija artifiċjali (taħlita ta' kostitwenti xotti)
Jum –5	— Iċċekkja l-pH tal-ħamrija artifiċjali — Kejjel id-WHC massima tal-ħamrija	— Iċċekkja l-pH tal-ħamrija artifiċjali — Kejjel id-WHC massima tal-ħamrija
Jum –5 sa –3	— Issepara d-dud għall-akklimatizzazzjoni	— Issepara d-dud għall-akklimatizzazzjoni
Jum –3 sa 0	— Akklimatizza d-dud għal tal-inqas 24 siegħa	— Akklimatizza d-dud għal tal-inqas 24 siegħa
Jum –1	— Xarrab bl-ilma l-ħamrija artifiċjali minn qabel u qassamha f'lottijiet	— Xarrab bl-ilma l-ħamrija artifiċjali minn qabel u qassamha f'lottijiet
Jum 0	— Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin — Applika s-sustanza kimika tat-test — Iżen is-sottostrat tat-test fir-reċipjenti tat-test — Ħallat fl-ikel — Daħħal id-dud — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità	— Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin — Applika s-sustanza kimika tat-test — Iżen sottostrat tal-ittestjar fir-reċipjenti tat-test — Ħallat fl-ikel — Daħħal id-dud — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità
Jum 7	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Agħlef
Jum 14	— Iddetermina l-mortalità tal-adulti — Numru stmat ta' friegħ — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Agħlef
Jum 21		— Osserva l-imġiba tal-adulti — Neħħi l-adulti — Iddetermina l-mortalità tal-adulti — Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Agħlef
Jum 28		— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Tagħlifx
Jum 35		— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Agħlef
Jum 42		— Għodd id-dud friegħ — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità

▼M6

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

39. Għalkemm tingħata ħarsa ġenerali fl-Appendiċi 7, ma tingħata ebda gwida statistika definittiva għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar f'dan il-metodu ta' ttestjar.

40. Fit-test tas-sejba tal-medda, il-punt ta' tmiem ewlieni huwa l-mortalità. Il-bidliet fl-imġiba (eż. l-inabbiltà biex titħaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjħu mal-ħajt tal-ħġieġ tar-reċipjent tat-test) u l-morfoloġija (eż. l-preżenza ta' feriti miftuħa) tad-dud adult għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieħ. L-analiżi probit (21) jew ir-rigressjoni loġistika għandhom normalment jiġu applikati biex tiġi ddeterminata l-LC_{50}. Madankollu, f'każijiet fejn dan il-metodu ta' analiżi mhuwiex xieraq (eż. jekk inqas minn tliet konċentrazzjonijiet bi qtil parzjali huma disponibbli), jistgħu jintużaw metodi alternattivi. Dawn il-metodi jistgħu jinkludu ċ-ċaqliq tal-medji (22), il-metodu Spearman-Karber trimmjat (23) jew interpolazzjoni sempliċi (eż. medja ġeometrika ta' LC_0 u LC_{100}, kif ikkalkolat mill-għerq kwadrat ta' LC_0 immoltiplikat b'LC_{100}).

41. Fit-test finali, il-punt ta' tmiem tat-test huwa l-fekondità (jiġifieri numru ta' frieħ prodotti). Madankollu, bħal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' dannu l-oħra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll. L-analiżi statistika titlob l-medja aritmetika u d-devjazzjoni standard għal kull trattament u għal kull kontroll għar-riproduzzjoni biex tkun ikkalkolata.

42. Jekk titwettaq analiżi tal-varjanza, id-devjazzjoni standard, s, u l-gradi ta' libertà, df, jistgħu jiġu sostitwiti mill-istima tal-varjanza raggruppata mill-ANOVA u l-gradi tiegħu tal-libertà, rispettivament — sakemm il-varjanza ma tiddependix fuq il-konċentrazzjoni. F'dan il-każ, uża l-varjanzi uniċi tal-kontroll u t-trattamenti. Dawn il-valuri huma ġeneralment ikkalkolati minn softwer statistiku kummerċjali permezz ta' riżultati għal kull reċipjent bħala repliki. Jekk ir-raggruppar tad-dejta għall-kontrolli negattivi u tas-solventi jidher raġonevoli iktar mill-ittestjar ma' wieħed minn dawk, dawn għandhom jiġu ttestjati biex jiġi osservat li mhumiex sinifikament differenti (għal testijiet xierqa ara l-paragrafu 45 u l-Appendiċi 7).

43. Testjar u inferenza statistika ulterjuri tiddependi fuq jekk il-valuri tar-repliki humiex normalment distribwiti u humiex omoġenji fir-rigward tal-varjanza tagħhom.

Stima tal-NOEC

44. L-applikazzjoni ta' testijiet qawwija għandha tiġi ppreferuta. Wieħed għandu juża informazzjoni eż. minn esperjenza preċedenti b'ring testing jew dejta storika oħra dwar jekk id-dejta storika hijiex distribwita b'mod approssimativ normali. L-omoġeneità tal-varjanza (omossedastiċità) hija iktar kritika. L-esperjenza tgħid li l-varjanza ħafna drabi tiżdied meta tiżdied il-medja. F'dawn il-każijiet, trasformazzjoni tad-dejta tista' twassal għal omossedastiċità. Madankollu, tali trasformazzjoni għandha tkun ibbażata fuq esperjenza b'dejta storika iktar milli dejta li tkun qiegħda tiġi investigata. B'dejta omoġenja, għandhom jitwettqu testijiet-t multipli bħat-test ta' Williams (α = 0,05, naħa waħda) (24)(25) jew f'ċerti każijiet, it-test ta' Dunnett (26)(27). Għandu jiġi nnotat li, fil-każ ta' replikazzjoni mhux indaqs, il-valuri-t tat-tabella għandhom jiġu korretti kif issuġġerit minn Dunnett u Williams. Xi drabi, minħabba varjazzjoni kbira, ir-risponsi ma jiżdidux/jonqsux b'mod regolari. F'dan il-każ ta' devjazzjoni qawwija mill-monotoniċità, it-test ta' Dunnett huwa iktar xieraq. Jekk hemm iktar devjazzjonijiet mill-omossedastiċità, jaf ikun raġonevoli li jiġu investigati l-effetti possibbli fuq il-varjanzi

▼M6

iktar mill-qrib biex jiġi deċiż jekk it-testijiet-t jistgħux jiġu applikati mingħajr it-telf ta' ħafna qawwa (28). Inkella, test-U multiplu, eż. t-test-U ta' Bonferroni skont Holm, (29), jew meta din id-dejta tesebixxi omossedastiċità iżda hija altrimenti konsistenti mar-rispons għad-doża ta' monoton sottostanti, jista' jiġi applikat test mhux parametriku ieħor [eż. Jonckheere-Terpstra (30) (31) jew Shirley (32) (33)] u ġeneralment ikun ippreferut minn testijiet-t tal-varjanza mhux indaqs. (ara wkoll l-iskema fl-Appendiċi 7).

45. Jekk ikun twettaq test tal-limitu u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri parametriċi tal-ittestjar (normalità, omoġenità), jista' jintuża t-test-t tal-Istudent parallel jew inkella l-proċedura ta' test-U ta' Mann-Whitney (29).

Estimi ta' EC_x

46. Biex jiġi kkalkolat kwalunkwe valur EC_x, jintużaw il-medji għal kull trattament għall-analiżi tar-rigressjoni (lineari jew mhux lineari), wara li tkun inkisbet funzjoni ta' rispons/doża xierqa. Għat-tkabbir tad-dud bħala rispons kontinwu, il-valuri EC_x- jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (35). Fost il-funzjonijiet xierqa għal dejta kwantali (mortalità/sopravivenza) u numru ta' wlied prodotti, huma l-funzjonijiet sigmoid, loġistiċi jew Weibull, li fihom tnejn sa erba' parametri, li xi wħud minnhom jistgħu jimmudellaw ukoll ir-risponsi ormetriċi. Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża ddaħħlet b'analiżi tar-rigressjoni lineari, għandha tinstab r^2 sinifikanti (koeffiċjent ta' determinazzjoni) u/jew gradjent bl-analiżi tar-rigressjoni qabel l-istima tal-EC_x billi jiddaħħal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba b'analiżi tar-rigressjoni. limiti ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati skont il-metodu ta' Fieller (iċċitat f'Finney (21)) jew metodi xierqa moderni oħra.

47. Inkella, ir-rispons jiġu mmudellat bħala perċentwali jew proporzjon tal-parametru ta' mudell li huwa interpretat bħala r-rispons medju ta' kontroll. F'dawn il-każijiet, il-kurva sigmoid (loġistika, Weibull) ħafna drabi tista' tiddaħħal fir-riżultati permezz ta' proċedura ta' rigressjoni probit (21). F'dawn il-każijiet, il-funzjoni ta' ppeżar għandha tiġi aġġustata għal risponsi metriċi kif mogħti minn Christensen (36). Madankollu, jekk tkun osservata ormeżi, l-analiżi probit għandha tiġi sostitwita minn funzjoni loġistika jew Weibull b'erba' parametri, imdaħħla minn proċedura ta' rigressjoni mhux lineari (36). Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża xierqa ma tistax tiddaħħal mad-dejta, wieħed jista' juża metodi alternattivi biex tiġi stmata l-EC_x, u l-limiti tal-kunfidenza tagħha, bħall-Moving Averages wara l-proċedura Thompson (22) u l-proċedura Spearman-Karber Trimmjata (23).

RAPPORT TAT-TEST

48. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— in-natura fiżika u, fejn ikunu rilevanti, il-proprjetajiet fiżikokimiċi (eż. solubbiltà fl-ilma, pressjoni tal-fwar);

— l-identifikazzjoni kimika tas-sustanza kimika tat-test skont in-nomenklatura ta' IUPAC, in-numru CAS, il-grupp, il-lott, il-formula strutturali u l-purità;

— id-data ta' skadenza tal-kampjun.

Speċijiet tat-test:

— l-annimali tat-test użati: l-ispeċi, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organiżmi u l-kundizzjonijiet ta' tgħammir.

Kundizzjonijiet tat-test:

— l-ingredjenti u l-preparazzjoni tal-ħamrija artifiċjali;

▼M6

— il-metodu ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— id-deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tat-test, inkluż it-temperatura, il-kontenut ta' umdità, il-pH, eċċ;

— deskrizzjoni sħiħa tad-disinn u l-proċedura sperimentali.

Riżultati tat-test:

— il-mortalità tad-dud adult wara ġimagħtejn u n-numru ta' frieħ fi tmiem tat-test tas-sejba tal-medda;

— il-mortalità tad-dud adult wara espożizzjoni ta' tliet ġimgħat u r-rekord sħiħ tal-frieħ fi tmiem it-test finali;

— kwalunkwe sintomu fiżiku jew patoloġiku osservat u l-bidliet fl-imġiba fl-organiżmi tat-test;

— l-LC_{50}, l-NOEC u/jew l-EC_x (eż. EC_{50}, EC_{10}) għar-riproduzzjoni jekk xi wħud minnhom ikunu applikabbli b'intervalli ta' kunfidenza, u graff tal-mudell imdaħħal għall-kalkolu tiegħu, l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati;

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

(3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

(5) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Tossiċità għall-Ħniex.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, huma applikabbli d-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

EC_x (konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organiżmi tat-test fil-perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. F'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet tal-effett huma espressi bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test.

LC_0 (L-ebda konċentrazzjoni letali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li ma toqtolx xi wieħed mill-organiżmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_0 hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LC_{50} (Konċentrazzjoni letali medja) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 50 % tal-organiżmi tat-test esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_{50} hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LC_{100} (Konċentrazzjoni letali totali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 100 % tal-organiżmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_{100} hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LOEC (Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$). F'dan it-test, l-LOEC hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar. Il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandhom normalment juru effett li huwa statistikament differenti mill-kontroll. Kwalunkwe devjazzjoni minn dawn ta' fuq fl-identifikazzjoni tal-LOEC għandha tiġi ġġustifikata fir-rapport tat-test.

NOEC (Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test eżattament taħt l-LOEC fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Rata ta' riproduzzjoni hija n-numru medju ta' dud frieħ prodott għal kull numru ta' adulti matul il-perjodu tal-ittestjar.

Sustanza kimika tal-ittestjar hija sustanza jew taħlita ttestjata matul dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M6

Appendiċi 2

Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima tal-ilma

Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima ta' ilma tal-ħamrija artifiċjali

Il-metodu li ġej instab li huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2.

Iġbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-ħamrija tat-test permezz ta' apparat xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru u, wara li timlieh bl-ilma u, qiegħdu fuq xtelliera f'banjumarija. It-tubu għandu jiddaħħal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-ħamrija. Imbagħad għandu jitħalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li ma jistax jinżamm l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-ħamrija, il-kampjun tal-ħamrija għandu jitħalla jitbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpoġġi t-tubu fuq saff ramel kwarzuż miħun irqiq imxarrab ħafna li huwa inkluż f'reċipjent magħluq (biex jiġi evitat li jinxef). Il-kampjun għandu mbagħad jintiżen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f′ \% ta′ massa xotta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

REFERENZI:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Appendiċi 3

Determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH ta' kampjun tal-ħamrija, huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO 10390 (Kwalità tal-Ħamrija — Determinazzjoni tal-pH).

Kwantità ddefinita tal-ħamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-ħamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' ħamrija) f'ħames darbiet il-volum tagħha ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku ($CaCl_2$). Is-sospensjoni mbagħad titħallat sew għal ħames minuti. Wara li titħawwad, is-sospensjoni titħalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Il-pH tal-fażi likwida mbagħad jitkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

REFERENZI:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Appendiċi 4

Kundizzjonijiet ta' kulturi ta' *Enchytraeus sp.*

L-enchytraeids tal-ispeċi*Enchytraeus albidus* (kif ukoll speċijiet *Enchytraeus* oħra) jistgħu jiġu kkulturati f'kaxex tal-plastik kbar (eż. 30 × 60 × 10 cm) mimlija b'taħlita 1:1 ta' ħamrija artifiċjali u ħamrija tal-ġnien, naturali mhux ikkontaminata. Materjal kompost għandu jiġi evitat peress li jaf ikun fih sustanzi kimiċi tossiċi bħal metalli tqal. Il-fawna għandha titneħħa mill-ħamrija qabel l-użu (eż. permezz ta' ffriżar qawwi). Jista' jintuża wkoll sottostrat li jinkludi biss ħamrija artifiċjali, iżda r-rata ta' riproduzzjoni tista' tkun inqas minn dik miksuba b'sottostrat ta' ħamrija mħallta. Is-sottostrat użat għall-kulturi għandu jkollu pH ta' 6,0 ± 0,5.

Il-kutura tinżamm fid-dlam f'temperatura ta' 15 sa 20 °C ± 2 °C. Temperaturi ogħla minn 23 °C għandhom jiġu evitati. Il-ħamrija għandha tinżamm umda iżda mhux imxarrba. Il-kontenut it-tajjeb ta' umdità fil-ħamrija huwa indikat meta jidhru qtar żgħar ta' ilma bejn is-swaba' meta l-ħamrija tingħafas ġentilment. Il-produzzjoni ta' kundizzjonijiet anossiċi għandha tiġi evitata billi jiġi żgurat li l-għotjien tal-kontenituri tal-kulturi jippermettu skambju gassuż xieraq mal-atmosfera. Il-ħamrija għandha tinqassam kull ġimgħa biex tiġi ffaċilitata l-arjazzjoni.

Id-dud jista' jintema' b'ħafur irrumblat. Il-ħafur għandu jinħażen f'reċipjenti ssiġillati u awtoklavat jew imsaħħan qabel l-użu sabiex tiġi evitata infestazzjoni b'dud tad-dqiq (eż. *Glyzyphagus sp.*, *Astigmata*, *Acarina*) jew b'dud predatur [eż. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Wara trattament bl-isħana, l-ikel għandu jintaħan biex b'hekk ikun jista' jinxtered faċilment fuq wiċċ il-ħamrija. Minn żmien għall-ieħor, il-ħafur irrumblat jista' jiġi ssupplimentat b'żieda ta' vitamini, ħalib u żejt tal-fwied tal-merluzz. Sorsi ta' ikel xierqa oħra huma l-ħmira tal-furnar u l-ikel tal-ħut "Tetramin".

It-tagħlif isir bejn wieħed u ieħor darbtejn fil-ġimgħa. Kwantità xierqa ta' ħafur irrumblat jinxtered fuq wiċċ il-ħamrija jew jitħallat b'attenzjoni fis-sottostrat meta tinqasam il-ħamrija biex tiġi ffaċilitata l-arjazzjoni. L-ammont assolut ta' ikel ipprovdut jiddependi fuq in-numru ta' dud preżenti fis-sottostrat. Bħala gwida, l-ammont ta' ikel għandu jiżdied jekk jiġi kkunsmat kollu fi żmien jum minn meta jiġi pprovdut. Bil-maqlub, jekk l-ikel xorta jibqa' fuq il-wiċċ fiż-żmien tat-tieni tagħif (ġimgħa wara) dan għandu jitnaqqas. L-ikel ikkontaminat bit-tkabbir fungali għandu jitneħħa u jiġi ssostitwit. Wara tliet xhur, id-dud għandu jiġi ttrasferit f'sottostrat li għadu kif jiġi ppreparat.

Il-kundizzjonijiet tal-kulturi jitqiesu sodisfaċenti jekk id-dud: (a) ma jippruvawx jitilqu mis-sottostrat tal-ħamrija, (b) jiċċaqalqu rapidament fil-ħamrija, (c) jesibixxu qoxra tleqq mingħajr frak tal-ħamrija aderenti, (d) bejn wieħed u ieħor għandhom kulur abjad, (e) jesibixxu varjetà ta' meded ta' etajiet fil-kulturi u (f) jirriproduċu b'kontinwità.

▼M6

Appendiċi 5

Twettiq tat-test bi speċijiet *Enchytraeus* oħra

Għażla ta' speċijiet

Jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn minbarra *E. albidus* iżda l-proċedura tal-ittestjar u l-kriterji tal-validità għandhom jiġu adattati skont dan. Peress li ħafna speċijiet *Enchytraeus* huma disponibbli minnufih u jistgħu jinżammu b'mod sodisfaċenti fil-laboratorju, il-kriterju l-iktar importanti għall-għażla ta' speċi differenti minn *E. albidus* hija r-rilevanza ekoloġika, kif ukoll is-sensittività paragunabbli. Jista' jkun hemm ukoll raġunijiet formali għal skambju ta' speċi. Pereżempju, f'pajjiżi fejn ma tinstabx *E. albidus* u ma tistax tiġi importata (eż. minħabba restrizzjonijiet ta' kwarantina), sejjer ikun meħtieġ li tintuża speċi *Enchytraeus* oħra.

Eżempji ta' speċijiet alternattivi xierqa

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): F'dawn l-aħħar snin, din l-ispeċi ħafna drabi ntużat f'studji ekotossikoloġiċi minħabba s-sempliċità tat-tgħammir u l-ittestjar tagħha. Madankollu, hija żgħira u dan jagħmel l-immaniġġar iktar diffiċili meta mqabbel ma' *E. albidus* (speċjalment fl-istadji qabel l-użu tal-metodu ta' tilwin). *E. crypticus* ma ħariġx li teżisti b'ċertezza fis-sit, peress li ġiet deskritta biss minn kulturi ta' ħniex. Għalhekk, ir-rekwiżiti ekoloġiċi tagħha mhumiex magħrufa.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Dan l-isem probabbilment li jkopri grupp ta' speċijiet relatati mill-qrib li huma morfoloġikament diffiċili biex jintgħarfu. L-użu tiegħu għall-ittestjar mhuwiex rakkomandat sakemm l-individwi użati f'test jistgħu jiġu identifikati mal-ispeċi. *E. buchholzi* ġeneralment tinstab f'mergħat u f'siti disturbati bħala ġniebi tat-toroq.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Din l-ispeċi kienet oriġinarjament magħrufa bħala *E. "minutus"*, iżda ġiet deskritta dan l-aħħar (1). Instabet l-ewwel minn U. Graefe (Hamburg) f'mergħa qrib St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, il-Ġermanja). *E. luxuriosus* hija madwar nofs id-daqs ta' E. albidus iżda ikbar mill-ispeċijiet l-oħra diskussi hawnhekk; dan jista' jagħmila alternattiva tajba għal *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Din l-ispeċi s'issa kienet irrapportata minn ħamriji minerali Ġermaniżi u Spanjoli, fejn hija komuni iżda ġeneralment mhux abbundanti ħafna. Meta mqabbla ma' speċijiet żgħar oħra ta' dan il-ġeneru, hija relattivament faċli biex tiġi identifikata. Xejn mhu magħruf dwar l-imġiba tagħha fit-testijiet tal-laboratorju jew is-sensittività tagħha għas-sustanzi kimiċi. Madankollu, instab li hija faċli biex tiġi kkulturata (E. Belotti, komunikazzjoni personali).

Kundizzjonijiet tat-tgħammir

L-ispeċijiet ta' *Enchytraeus* kollha msemmija hawn fuq jistgħu jiġu kkulturati fl-istess sottostrati użati għal *E. albidus*. Id-daqs żgħir tagħhom ifisser li r-reċipjenti tal-kultura jistgħu jkunu iżgħar u li, filwaqt li jista' jintuża l-istess ikel, id-daqs tal-proporzjon għandu jiġi aġġustat. Iċ-ċiklu tal-ħajja ta' dawn l-ispeċijiet huwa iqsar milli għal *E. albidus* u t-tagħlif għandu jsir b'mod iktar frekwenti.

Kundizzjonijiet tat-test

Il-kundizzjonijiet tat-test huma ġeneralment l-istess bħal dawk li japplikaw għal *E. albidus*, ħlief li:

— id-daqs tar-reċipjent tat-test jista' (iżda ma għandux bżonn) ikun iżgħar; id-durata tat-test tar-riproduzzjoni jista' (iżda ma għandux bżonn) ikun iqsar, jiġifieri erba' gimgħat minflok sitta;

— madankollu, id-durata tat-Test tas-Sejba tal-Medda ma għandhiex titbidel;

— fid-dawl tad-daqs żgħir tad-dud frieħ, l-użu ta' metodu ta' titbigħ huwa rakkomandat b'mod qawwi għall-għadd;

— il-kriterju ta' validità relatat man-"numru ta' frieħ għal kull reċipjent tat-test fil-kontroll" għandu jitbidel għal "50".

▼**M6**

REFERENZI

(1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

Appendiċi 6

Deskrizzjoni ddettaljata tat-tekniki ta' estrazzjoni

Titbigħ b'aħmar ta' Bengal

Dan il-metodu, li oriġinarjament ġie żviluppat f'ekoloġija limnika (1) kien propost l-ewwel darba għall-għadd ta' enchytraeids frieħ fit-test tar-riproduzzjoni ta' Enchytraeidae minn W. de Coen (Università ta' Ghent, il-Belġju). Indipendentement, verżjoni mmodifikata (Bengalred imħallat b'formaldeid minflok etanol) kienet żviluppata minn RIVM Bilthoven (2)(3).

Fi tmiem it-test finali (jiġifieri wara sitt ġimgħat), il-ħamrija fir-reċipjent tat-test tiġi ttrasferita għal kontenitur baxx. Reċipjent Bellaplast jew photo basin b'qiegħ imqabbeż huwa utli għal dan il-fini, dan tal-aħħar peress li l-"kustilji" jillimitaw il-moviment tad-dud fil-qasam ta' osservazzjoni. Il-frieħ huma fissi mal-etanol (madwar 5 ml għal kull replikat). Imbagħad ir-reċipjenti jimtlew bl-ilma sa strat ta' 1 sa 2 cm. Jiżdiedu ftit qtar (200 sa 300 µl) ta' Bengal red (1 % soluzzjoni fl-etanol) (0,5 % eosin hija alternattiva) u ż-żewġ komponenti jitħalltu b'attenzjoni. Wara 12-il siegħa, id-dud għandu jittebba' b'kulur ħamrani u għandu jkun faċli biex jingħadd peress li sejjer jitqiegħed fuq wiċċ is-sottostrat. Inkella, it-taħlita tas-sottostrat/alkoħol tista' tinħasel permezz ta' passatur (daqs tax-xibka: 0,250 mm) qabel ma jingħadd id-dud. Permezz ta' din il-proċedura, il-kaolinit, il-pit, u xi parti mir-ramel sejjer jinħasel u wieħed sejjer ikun jista' jara u jgħodd id-dud b'kulur ħamrani. L-użu ta' lentijiet illuminati (daqs tal-lenti tal-inqas 100 × 75 mm b'fattur ta' ingrandiment ta' 2 sa 3x) sejjer jiffaċilita wkoll l-għadd.

It-teknika ta' titbigħ tnaqqas il-ħin ta' għadd għal ftit minuti f'kull reċipjent u bħala gwida għandu jkun possibbli għal kull persuna li tivvaluta r-reċipjenti kollha minn test wieħed f'massimu ta' jumejn.

Estrazzjoni mxarrba

L-estrazzjoni mxarrba għandha tinbeda mill-ewwel malli jintemm it-test. Il-ħamrija minn kull reċipjent tat-test titqiegħed f'passaturi tal-plastik b'daqs tax-xibka ta' madwar 1 mm. Il-passaturi mbagħad jiġu sospiżi fi skutelli tal-plastik mingħajr ma jintmess il-qiegħ. L-iskutelli jimtlew b'attenzjoni bl-ilma sakemm il-kampjuni fil-passaturi jkunu kompletament taħt wiċċ l-ilma. Biex tiġi assigurata rata ta' rkupru ta' iktar minn 90 % tad-dud preżenti, għandu jintuża perjodu ta' estrazzjoni ta' 3 ijiem f'20 ± 2 °C. Fi tmiem il-perjodu ta' estrazzjoni, il-passaturi jitneħħew u l-ilma (ħlief għal ammont żgħir) jitferra' bil-mod, b'attenzjoni biex ma jiġix iddisturbat in-naqal f'qiegħ l-iskutelli. L-iskutelli tal-plastik imbagħad jitħalltu ftit biex in-naqal jiġi sospiż fl-ilma tal-madwar. L-ilma huwa ttrasferit f'dixx petri wara li l-frak tal-ħamrija jkun qagħad), l-enchytraeids jistgħu jiġu identifikanti, jitneħħew u jingħaddu permezz ta' sterjomikroskopju u pinzetti tal-azzar rotob.

Żamma fil-wiċċ

Metodu bbażat fuq iż-żamma fil-wiċċ ġie deskritt f'nota minn R. Kuperman (4). Wara li jiġu stabbiliti l-kontentut tar-reċipjenti tat-test b'etanol, il-ħamrija titfawwar b'Ludox (AM-30 silika kollojdali, 30 wt. % sospensjoni fl-ilma) bejn 10 sa 15-il mm 'il fuq minn wiċċ il-ħamrija. Wara li l-ħamrija titħallat sew mal-aġent ta' flotazzjoni għal 2 — 3 minuti, id-dud frieħ li jkun jinsab fil-wiċċ jista' jingħadd faċilment.

REFERENZI

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

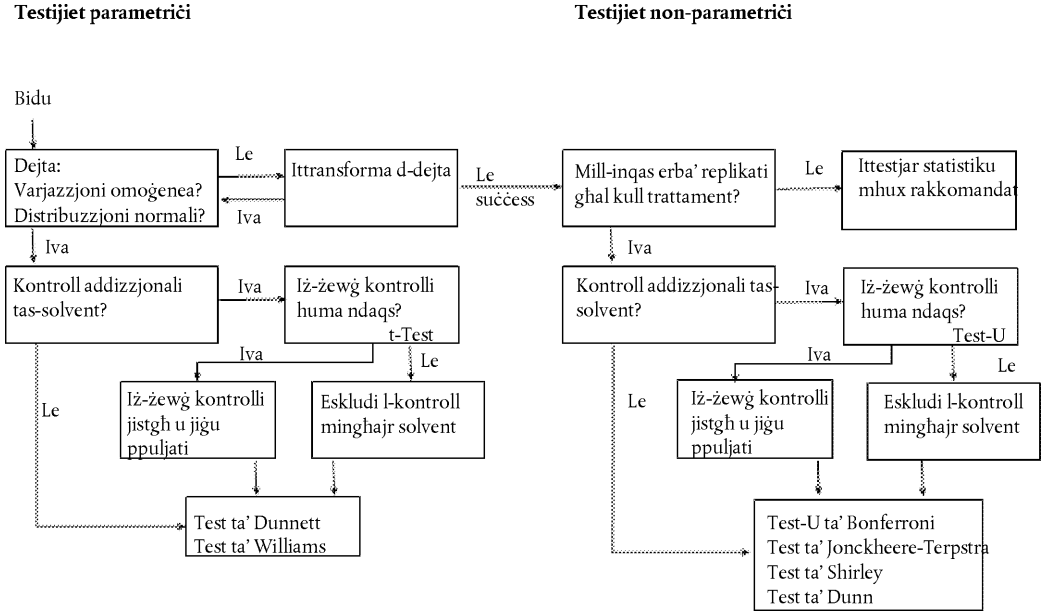
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼**M6**

Appendiċi 7

Harsa ġenerali lejn il-valutazzjoni statistika tad-dejta (determinazzjoni tal-NOEC)



▼M6

C.33. **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ĦNIEX (*EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI*)**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 222 tal-OECD (2004). Huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-produzzjoni riproduttiva (u punti ta' tmiem letali oħra) tal-ispeċijiet ta' ħniex *Eisenia fetida* (Savigny 1826) jew *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). It-test sarlu ring test (3). Jeżisti metodu ta' ttestjar għat-tossiċità akuta tal-ħniex (4). Ġew ippubblikati numru ta' linji gwida internazzjonali u nazzjonali oħra għal testijiet akuti u kroniċi tal-ħniex (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida /Eisenia andrei* huma kkunsidrati bħala wieħed mir-rappreżentanti tal-fawna tal-ħamrija u l-ħniex b'mod partikolari. Hija disponibbli informazzjoni ta' sfond dwar l-ekoloġija tal-ħniex u l-użu tagħhom fl-ittestjar ekotossikoloġiku (7)(9)(10)(11)(12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Id-dud adult huwa espost għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallata mll-ħamrija jew, fil-każ ta' pestiċidi, applikati fil-ħamrija jew ġo fiha permezz ta' proċeduri konsistenti mal-mudell ta' użu tas-sustanza kimika. Il-metodu ta' applikazzjoni huwa speċifiku għall-fini tat-test. Il-medda ta' konċentrazzjonijiet tat-test huwa magħżul biex jinkludi dawk li x'aktarx jikkawżaw effett sottoletali jew letali f'perjodu ta' tmien ġimgħat. Il-mortalità u l-effetti ta' tkabbir fuq id-dud adult huma ddeterminati wara 4 ġimgħat ta' espożizzjoni. L-adulti mbagħad jitneħħew mill-ħamrija u l-effetti fuq ir-riproduzzjoni vvalutati wara 4 ġimgħat oħra billi jingħadd in-numru ta' wlied preżenti fil-ħamrija. Il-produzzjoni riproduttiva tad-dud hija esposta għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbel ma' dik tal-kontroll(i) sabiex tiġi ddeterminata (i) il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) u/jew (ii) EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) permezz ta' mudell ta' rigressjoni biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża tnaqqis ta' x % fil-produzzjoni riproduttiva. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom jibbrakitjaw l-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) biex b'hekk l-EC_x imbagħad tiġi mill-interpolazzjoni iktar milli l-estrapolazzjoni (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

4. L-informazzjoni li ġejja relatata mas-sustanza kimika tat-test għandha tkun disponibbli biex tassisti fid-disinn ta' proċeduri tat-test xierqa:

— is-solubbiltà fl-ilma;

— log K_{ow};

— il-pressjoni tal-fwar;

— u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba fl-ambjent, fejn ikun possibbli (eż. ir-rata ta' fotoliżi u r-rata ta' idroliżi fejn ikun rilevanti għal xejriet ta' applikazzjoni).

5. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi kollha, irrispettivament mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, iddefiniti hawnhekk bħala sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-partizzjoni tal-arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew għas-sustanzi kimiċi bi pressjonijiet tal-fwar li jaqbzu 0,0133 Pa f'25 °C.

6. Ma ssir ebda konċessjoni f'dan il-metodu ta' ttestjar għal degradazzjoni possibbli tas-sustanza kimika tat-test matul il-perjodu tat-test. Għaldaqstant, wieħed ma jistax jassumi li l-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni sejrin jinżammu fil-valuri inizjali matul it-test kollu. Hija rakkomandata analiżi kimika tas-sustanza kimika tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test f'dak il-każ.

▼M6

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

7. L-NOEC u/jew l-EC_x ta' sustanza kimika ta' referenza għandhom jiġu ddeterminati biex jipprovdu assigurazzjoni li l-kundizzjonijiet tat-test tal-laboratorju huma adegwati u biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organiżmi tal-ittestjar ma jinbidilx statistikament maż-żmien. Huwa rakkomandabbli li sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata tal-inqas darba f'sena jew, meta jitwettaq ittestjar bi frekwenza iktar baxxa, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test. Karbendażim jew benomil huma sustanzi kimiċi ta' referenza xierqa li ntwerew li jaffettwaw ir-riproduzzjoni (3). Għandhom jiġu osservati effetti sinifikanti bejn (a) 1 u 5 mg ta' massa xotta tas-sustanza attiva (a.i.)/kg jew (b) 250-500 g/ha jew 25-50 mg/m^2. Jekk standard tat-tossiċità pożittiv huwa inkluż fis-serje tat-test, tintuża konċentrazzjoni waħda u n-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak fil-kontrolli.

VALIDITÀ TAT-TEST

8. Il-kriterji li ġejjin għandhom jiġu stratifikati fil-kontrolli għal riżultat tat-test biex jitqies validu:

— kull replikat (li fih 10 adulti) li jkun ipproduċa ≥ 30 ferħ sa tmiem it-test;

— il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-riproduzzjoni li għandu jkun ta' ≤ 30 %;

— il-mortalità tal-adulti matul l-4 ġimgħat inizjali tat-test li għandha tkun ta' ≤ 10 %.

Fejn test jonqos milli jissodisfa l-kriterji ta' validità ta' hawn fuq, it-test għandu jiġi tterminat sakemm ma tkunx tista' tiġi pprovduta ġustifikazzjoni biex isir it-test. Il-ġustifikazzjoni għandha tiġi inkluża fir-rapport.

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Tagħmir

9. Għandhom jintużaw żewġ kontenituri tal-ittestjar li huma magħmula mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor ta' kapaċità ta' litru sa żewġ litri. Il-kontenituri għandu jkollhom erja transsettorjali ta' madwar 200 cm^2 biex b'hekk jinkiseb sottostrat ta' umdità li huwa fond madwar 5-6 cm meta tiżdied massa ta' sottostrat xotta ta' 500 sa 600 g. Id-disinn tal-għatu tal-kontenitur għandu jippermetti l-iskambju gassuż bejn is-sottostrat u l-atmosfera u l-aċċess għad-dawl (eż. permezz ta' għatu trasparenti mtaqqab) filwaqt li jiġi evitat li d-dud jaħrab. Jekk l-ammont tas-sottostrat tat-test użat huwa sostanzjalment iktar minn 500 sa 600 g għal kull kontenitur tal-ittestjar, in-numru ta' dud għandu jiżdied proporzjonalment.

10. Huwa meħtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:

— armadju tat-tnixxif;

— sterjomikroskopju;

— miter tal-pH u fotometru;

— imwieżen preċiżi xierqa;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni jkollhom l-għotjien);

— inkubatur jew kamra żgħira b'arja kondizzjonata;

— pinzetti, ganċijiet jew ingassi;

— banjumarija.

▼M6

Preparazzjoni tal-ħamrija artifiċjali

11. F'dan it-test tintuża ħamrija artifiċjali (5)(7) bil-kompożizzjoni li ġejja (abbażi tal-piżijiet xotti, li titnixxef għal piż kostanti ta' 105 °C):

— 10 fil-mija tal-pit ta' sfanju (qrib kemm jista' jkun għal pH 5,5-6,0, l-ebda fdalijiet tal-pjanta viżibbli, miftħun irqiq, imnixxef għal kontenut ta' umdità mkejjel);

— 20 fil-mija tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 fil-mija);

— 0,3 sa 1,0 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$, polverizzat, grad tal-analiżi) biex jinkiseb pH inizjali ta' 6,0 ± 0,5.

— 70 % ramel kwarzuż imnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron.

Nota 1: L-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ sejjer jiddependi fuq il-komponenti tas-sottostrat tal-ħamrija inkluż l-ikel, u għandu jiġi ddeterminat mill-kejliet tas-sottokampjuni tal-ħamrija eżattament qabe it-test. Il-pH jitkejjel f'kampjun imħallat f'1 M ta' soluzzjoni ta' klorur tal-potassju (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M klorur tal-kalċju ($CaCl_2$) (13).

Nota 2: Il-kontenut tal-karbonju organiku tal-ħamrija artifiċjali jaf jitnaqqas eż. billi jitnaqqas il-kontenut ta' pit sa 4-5 % u jiżdied il-kontenut ta' pit skont dan. B'tali tnaqqis fil-kontenut tal-karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test mill-ħamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test għad-dud tista' tiżdied. Intwera li Eisenia fetida jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità dwar ir-riproduzzjoni meta jiġi ttestjat f'ħamrija tal-għelieqi b'kontenut ta' karbonju organiku iktar baxx (eż. 2,7 %) (14), u hemm esperjenza li dan jista' jintlaħaq ukoll f'ħamrija artifiċjali b'5 % pit. Għalhekk, mhuwiex meħtieġ qabel tintuża tali ħamrija f'test finali li tintwera l-adegwatezza tal-ħamrija artifiċjali biex it-test ikun jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità sakemm il-kontenut tal-pit jitbaxxa iktar minn dak speċifikat hawn fuq.

Nota 3: Meta tintuża ħamrija naturali f'ittestjar addizzjonali (eż. ta' livell ogħla), għandha tintwera wkoll l-adegwatezza tal-ħamrija u l-ilħuq tal-kriterji ta' validità tat-test.

12. Il-kostitwenti xotti tal-ħamrija jitħalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira) f'żoni b'ventilazzjoni tajba. Qabel jinbeda t-test, il-ħamrija artifiċjali xotta tixxarrab billi jiżdied biżżejjed ilma mhux dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut ta' ilma finali, li huwa 40 % sa 60 % tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima (li tikkorrispondi għal 50 ± 10 % tal-massa xotta ta' umdità). Dan sejjer jipproduċi sottostrat li ma għandu ebda ilma permanenti jew liberu meta jiġi kkompressat bl-idejn. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) massima tal-ħamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2, ISO 11274 (15) jew standard tal-UE ekwivalenti.

13. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi applika fuq wiċċ il-ħamrija jew titħallat fil-ħamrija mingħajr l-ilma, l-ammont finali tal-ilma jista' jitħallat fil-ħamrija artifiċjali matul il-preparazzjoni tal-ħamrija. Jekk is-sustanza kimika tat-test titħallat fil-ħamrija flimkien ma' xi ilma, l-ilma addizzjonali jista' jiżdied flimkien mas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 19).

14. Il-kontenut ta' umdità fil-ħamrija huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test skont ISO 11465 (16) jew l-istandard tal-UE ekwivalenti, u l-pH tal-ħamrija skont l-Appendiċi 3 jew l-ISO 10390 (13) jew standard tal-UE ekwivalenti. Dawn id-determinazzjonijiet għandhom jitwettqu f'kampjun ta' ħamrija ta'

▼M6

kontroll u kampjun ta' kull ħamrija ta' konċentrazzjoni tat-test. Il-pH tal-ħamrija ma għandux jiġi aġġustat meta s-sustanzi kimiċi aċiduży jew bażiċi huma ttestjati. Il-kontenut ta' umdità għandu jiġi ssorveljat matul it-test billi l-konteniturі jintiżnu kull ċertu żmien (ara l-paragrafi 26 u 30).

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

15. L-ispeċi użata fit-test hija *Eisenia fetida* jew *Eisenia andrei* (1)(2). Biex jinbeda t-test huwa meħtieġ dud adult li għandu bejn xahrejn u sena u bi klitellu. Id-dud għandu jintgħażel minn kultura sinkronizzata bi struttura ta' età relattivament omoġenja (Appendiċi 4). L-individwi f'grupp tal-ittestjar ma għandhomx ikunu differenti fl-età b'aktar minn 4 ġimgħat.

16. Id-dud magħżul għandu jiġi akklimatizzat għal tal-inqas jum bit-tip ta' sottostrat ta' ħamrija artifiċjali li għandu jintuża għat-test. Matul dan il-perjodu, id-dud għandu jingħalef bl-istess ikel li għandu jintuża fit-test (ara l-paragrafi 31 sa 33).

17. Gruppi ta' 10 dud għandhom jintiżnu individwalment biex il-gruppi jiġu assenjati b'mod każwali għall-konteniturі tat-test fil-bidu tat-test. Id-dud jinħasel qabel ma jintiżen (b'ilma dejonizzat) u l-ilma żejjed jitneħħa billi d-dud jitqiegħed għal ftit ħin fuq il-karta filtru. Il-massa mxarrba tad-dud individwali għandha tkun bejn 250 u 600 mg.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test

18. Jistgħu jintużaw żewġ metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: it-taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija (ara l-paragrafi 19-21) jew l-applikazzjoni ma' wiċċ il-ħamrija (ara l-paragrafi 22-24). L-għażla tal-metodu xieraq tiddependi fuq il-fini tat-test. B'mod ġenerali, huwa rakkomandat it-taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija. Madankollu, jaf ikunu meħtieġ proċeduri għal applikazzjoni li huma konsistenti bi prattika agrikola normali (eż. l-isprejjar tal-formulazzjoni likwida jew l-użu ta' formulazzjonijiet ta' pestiċidi speċjali bħal granuli jew kisi taż-żerriegħa). Is-solventi użati fit-trattament tal-għajnuna tal-ħamrija bis-sustanza kimika tat-test abbażi tat-tossiċità baxxa tagħhom għall-ħniex u għandu jiġi inkluż kontroll tas-solventi xieraq fid-disinn tat-test (ara l-paragrafu 27).

It-taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

19. Soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'ilma dejonizzat tiġi ppreparata immedjatament qabel jinbeda t-test f'kwantità biżżejjed għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni waħda. Jaf ikun meħtieġ kosolvent biex tiġi ffaċilitata l-preparazzjoni tas-soluzzjoni tat-test. Huwa konvenjenti li tipprepara ammont ta' soluzzjoni meħtieġa biex jintlaħaq il-kontenut ta' umdità finali (40 sa 60 % tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima). Is-soluzzjoni titħallat sew mas-sottostat tal-ħamrija qabel tiġi introdotta f'kontenitur tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

20. Is-sustanza kimika tat-test tinħall f'volum żgħir ta' solvent organiku xieraq (eż. aċetun) u mbagħad tiġi sprejjata fuq kwantità żgħira ta' ramel kwarzuż irqiq. Imbagħad is-solvent jitneħħa b'evaporazzjoni f'għatu għad-dħaħen għal tal-inqas żewġ minuti. Ir-ramel ittrattat imbagħad jitħallat sew mal-ħamrija artifiċjali mxarrba minn qabel. Imbagħad jiżdied u jitħallat miegħu ilma dejonizzat (ammont meħtieġ) biex jintlaħaq kontenut ta' umdità finali ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità massima ta' żamma tal-ilma. Imbagħad il-ħamrija tkun lesta biex titqiegħed f'reċipjenti tal-konteniturі tat-test. Għandha tingħata attenzjoni li xi solventi jaf ikunu tossiċi għall-ħniex.

▼M6

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma u solventi organiċi

21. Tiġi ppreparata taħlita li tinkludi 10 g ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq bi kwantità tas-sustanza kimika tat-test meħtieġa biex tintlaħaq il-konċentrazzjoni tat-test fil-ħamrija. It-taħlita mbagħat titħallat sew bil-ħamrija artifiċjali mxarrba minn qabel. Imbagħad jiżdied u jitħallat miegħu ilma dejonizzat (ammont meħtieġ) biex jintlaħaq kontenut ta' umdità finali ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima. Il-ħamrija mbagħad tkun lesta biex titqiegħed f'reċipjenti tal-kontenituri tat-test.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-ħamrija

22. Il-ħamrija tiġi ttrattata wara li jiżdied id-dud. Il-kontenituri tat-test l-ewwel jimtlew bis-sottostrat ta' ħamrija umda u d-dud miżun jitqiegħed fuq il-wiċċ. Dud b'saħħtu normalment iħaffer toqba mill-ewwel fis-sottostrat u għaldaqstant dak kollu li jibqa' fuq il-wiċċ wara 15-il minuta jiġi ddefinit bħala danneġġjat u għandu jiġi sostitwit. Jekk id-dud jiġi sostitwit, dak ġdid u dak sostitwit għandu jintiżen biex b'hekk il-piż ħaj totali tal-grupp ta' espożizzjoni tad-dud u l-piż totali tal-kontenitur bid-dud fil-bidu jkun magħruf.

23. Is-sustanza kimika tat-test hija applikata. Ma għandhiex tiżdied mal-ħamrija fi żmien nofs siegħa mill-introduzzjoni tad-dud (jew jekk id-dud ikun preżenti fuq wiċċ il-ħamrija) biex b'hekk tiġi evitata kwalunkwe espożizzjoni diretta għas-sustanza kimika tat-test b'kuntatt mal-ġilda. Meta s-sustanza kimika tat-test hija pestiċida jaf ikun xieraq li tiġi applikata fuq wiċċ il-ħamrija billi tiġi sprejata. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi applikata fuq wiċċ il-ħamrija kemm jista' jkun b'mod uniformi permezz ta' apparat tal-isprejjar fuq skala tal-laboratorju xierqa biex tiġi stimulata l-applikazzjoni tal-isprej fis-sit. Qabel l-applikazzjoni, l-għatu tal-kontenitur tal-ittestjar għandu jitneħħa u jiġi sostitwit minn inforra li tipproteġi l-ħitan tal-ġenb tal-kontenitur mill-isprej. L-inforra tista' tkun magħmula minn kontenitur tat-test bil-bażi mneħħija. L-applikazzjoni għandha ssir f'temperatura ta' 20 ± 2 °C ta' varjazzjoni u għal soluzzjonijiet milwiema, emulsjonijiet jew dispersjonijiet b'rata ta' applikazzjoni ta' bejn 600 u 800 µl/m^2. Ir-rata għandha tiġi vverifikata permezz ta' teknika ta' kalibrazzjoni xierqa. Għandhom jiġu applikati formulazzjonijiet speċjali bħal granuli jew kisi taż-żerriegħa b'mod konsistenti mal-użu agrikolu.

24. Il-kontenituri tat-test għandhom jitħallew miftuħa għal perjodu ta' siegħa biex jippermettu l-evaporazzjoni tas-solvent volatili assoċjat mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Għandha tingħata attenzjoni biex l-ebda dud ma jaħrab mir-reċipjenti tat-test f'dan il-perjodu ta' ħin.

PROĊEDURA

Gruppi tat-test u kontrolli

25. Hija rakkomandata tagħbija ta' 10 ħniex f'500 — 600 mg ta' massa xotta ta' ħamrija artifiċjali (jiġifieri 50-60 mg ta' ħamrija għal kull dudu). Jekk jintużaw kwantitajiet ikbar ta' ħamrija, kif jista' jkun il-każ fil-pestiċidi tat-test b'mod speċjali ta' applikazzjoni bħall-kisi taż-żerriegħa, it-tagħbija ta' 50-60 g ta' ħamrija għal kull dudu għandha tinżamm billi jiżdied in-numru ta' dud. Għal kull kontroll jiġu ppreparati għaxar dud u kontenitur ta' trattament. Id-dud jinħasel bl-ilma u jintmesaħ u mbagħad jitqiegħed fuq karta assorbenti għal perjodu qasir biex l-ilma żejjed ikun jista' jissaffa.

26. Biex jiġu evitati żbalji sistematiċi fid-distribuzzjoni tad-dud fil-kontenituri tal-ittestjar, l-omoġenità tal-popolazzjoni tat-test għandha tiġi ddeterminata billi jintiżnu b'mod individwali 20 dudu li ttieħed kampjun tagħhom b'mod każwali mill-popolazzjoni li minnha għandhom jittieħdu d-dud tat-test. Wara li tiġi żgurata l-omoġenità, jintgħażlu, jintiżnu u jiġu assenjati lottijiet ta' dud f'kontenituri tat-test permezz ta' proċedura ta' randomizzazzjoni. Wara ż-żieda tad-dud tat-test, għandu jitkejjel il-piż ta' kull kontenitur tal-ittestjar

▼M6

biex jiġi żgurat li jkun hemm piż inizjali li jista' jintuża bħala l-bażi għall-monitoraġġ tal-kontenut ta' umdità fil-ħamrija matul it-test kollu kif deskritt fil-paragrafu 30. Imbagħad il-konteniturі tat-test jitgħattew kif deskritt fil-paragrafu 9 u jitqiegħdu f'kompartiment tat-test.

27. Jiġu ppreparati kontrolli xierqa għal kull wieħed mill-metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test deskritti fil-paragrafi 18 sa 24. Il-proċeduri rilevanti deskritti huma segwiti għall-preparazzjoni tal-kontrolli ħlief li s-sustanza kimika tat-test ma tiżdiedx. Għalhekk, fejn ikun xieraq, is-solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż jew veikoli oħra jiġu applikati mal-kontrolli f'konċentrazzjonijiet/ammonti konsistenti ma' dawk użati fit-trattamenti. Fejn jintuża solvent jew veikolu ieħor biex tiżdied is-sustanza kimika tat-test, għandu jiġi ppreparat u ttestjat ukoll kontroll addizzjonali mingħajr il-veikolu jew is-sustanza kimika tat-test biex jiġi żgurat li l-veikolu ma għandu ebda piż fuq ir-riżultat.

Kundizzjonijiet tat-test

28. It-temperatura tat-test hija 20 ± 2 °C. It-test jitwettaq taħt ċikli fid-dawl u fid-dlam kkontrollati (preferibbilment 16-il siegħa fid-dawl u 8 sigħat fid-dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux fiż-żona tar-reċipjenti tat-test.

29. Il-konteniturі tat-test mhumiex ossiġenati matul it-test iżda d-disinn tar-reċipjenti tat-test għandu jipprovdi opportunità għall-iskambju ta' gass filwaqt li jillimita l-evaporazzjoni ta' umdità (ara paragrafu 9).

30. Il-kontenut ta' ilma tas-sottostrat ta' ħamrija fil-konteniturі tat-test jinżamm matul it-test kollu billi jerġgħu jiġu ppeżati l-konteniturі tat-test (mingħajr l-għotjien tagħhom) perjodikament. It-telf huwa rifornit kif meħtieġ b'ilma dejonizzat. Il-kontenut ta' ilma ma għandux ivarja b'aktar minn 10 % minn dak fil-bidu tat-test.

Tagħlif

31. Kwalunkwe ikel ta' kwalità li ntwera li huwa xieraq għal tal-inqas għaż-żamma tal-piż tad-dud matul it-test, huwa kkunsidrat aċċettabbli. L-esperjenza wriet li l-ħafur, id-demel tal-baqar jew iż-żwiemel huwa ikel adattat. Għandhom isiru verifiki biex jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel minn fejn jinkiseb id-demm mhumiex soġġetti għal medikazzjoni jew trattament b'sustanzi kimiċi, bħalma huma promoturi tat-tkabbir, nematiċidi jew prodotti veterinarji simili li jistgħu jaffettwaw b'mod ħażin id-dud matul it-test. Huwa rakkomandat demel tal-baqar miġbur b'mod proprju, peress li l-esperjenza wriet li d-demel tal-baqar disponibbli fil-kummerċ użat bħala fertilizzant fil-ġonna jaf ikollu effetti avversi fuq id-dud. Id-demel għandu jitnixxef bl-arja, jintaħan irqiq u jiġi pasturizzat qabel l-użu.

32. Kull lott ġdid ta' ikel, għandu jintgħalef lil kultura tad-dud mhux tat-test qabel jintuża f'test biex jiġi żgurat li huwa ta' kwalità xierqa. It-tkabbir u l-produzzjoni ta' fosdqiet ma għandhomx jitnaqqsu meta mqabbel ma' dud miżmum f'sottostrat li ma fihx il-lott il-ġdid ta' ikel (kundizzjonijiet kif deskritti fil-metodu ta' ttestjar C.8(4)).

33. L-ikel l-ewwel huwa pprovdut jum wara ż-żieda tad-dud u l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija. Madwar 5 g ta' ikel jinfirex fuq wiċċ il-ħamrija ta' kull kontenitur u jixxarrab b'ilma mhux dejonizzat (madwar 5 ml sa 6 ml f'kull kontenitur). Minn hemm 'il quddiem l-ikel huwa pprovdut darba f'ġimgħa matul il-perjodu ta' ttestjar ta' 4 ġimgħat. Jekk l-ikel jibqa'

▼M6

ma jittikilx, il-proporzjon għandu jitnaqqas biex jiġi evitat tkabbir jew iffurmar fungali. L-adulti jitneħħew mill-ħamrija fit-28 jum tat-test. Imbagħad jingħataw 5 g oħra ta' ikel f'kull kontenitur tat-test. Ma jsir ebda tagħlif ieħor matul l-4 ġimgħat li jifdal mit-test.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

34. L-għarfien minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għandu jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa, eż. minn test akut (4) u/jew minn studji tas-sejba tal-medda. Meta jkun meħtieġ, test tas-sejba tal-medda jitwettaq pereżempju, b'ħames konċentrazzjonijiet tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg (massa xotta tal-ħamrija). Replikat wieħed għal kull trattament u kontroll huwa suffiċjenti. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda hija ġimagħtejn u l-mortalità tiġi vvalutata fi tmiem it-test.

Disinn sperimentali

35. Peress li ma tistax tiġi predefinita statistika ta' sommarju unika għat-test, dan il-metodu ta' ttestjar jaħseb għad-determinazzjoni tal-NOEC u l-EC_x. X'aktarx li tkun meħtieġa NOEC minn awtoritajiet regolatorji għall-futur prevedibbli. Fil-futur qarib jista' jiġi adottat użu iktar mifrux tal-EC_x, li jirriżulta minn kunsiderazzjonijiet statistiċi u ekoloġiċi. Għalhekk, huma proposti tliet disinji, abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test ta' metodu ta' ttestjar tar-riproduzzjoni tal-enchytraeids (17).

36. Fl-istabbiliment tal-medda ta' konċentrazzjonijiet, wieħed għandu jżomm f'moħħu dan li ġej:

— Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames/tnax-il konċentrazzjoni f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 2,0.

— Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}), huwa rakkomandat numru adegwat ta' konċentrazzjonijiet biex jiġu kkawżati tal-inqas erba' risponsi b'medja statistikament differenti b'mod sinifikanti f'dawn il-konċentrazzjonijiet. Huma rakkomandati tal-inqas żewġ repliki għal kull konċentrazzjoni u sitt repliki ta' kontroll. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugwali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjoni.

— Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal-EC_x. Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 1,8.

Durata u kejliet tat-test

37. Fit-28 Jum, id-dud adult ħaj kien osservat u magħdud. Kwalunkwe imġiba mhux tas-soltu (eż. inabbiltà li jħaffru fil-ħamrija; u nuqqas ta' ċaqliq) u fil-morfoloġija (eż. feriti miftuħa) tiġi rreġistrata. Id-dud adult kollu mbagħad jitneħħa mir-reċipjenti tat-test u jingħadd u jintiżen. It-trasferiment tal-ħamrija li fiha d-dud lejn trej nadif qabel il-valutazzjoni jista' jiffaċilita t-tiftix għall-adulti. Id-dud estratt mill-ħamrija għandu jinħasel qabel ma jintiżen (b'ilma dejonizzat) u l-ilma żejjed jitneħħa billi d-dud jitqiegħed għal ftit ħin fuq il-karta filtru. Kwalunkwe dudu li ma jinstabx f'dan il-ħin għandu jiġi rreġistrat bħala mejjet, peress li wieħed jassumi li tali dud miet u ddekompona qabel il-valutazzjoni.

▼M6

38. Jekk il-ħamrija tneħħiet mill-kontenituri din terġa' titpoġġa' f'postha (mingħajr id-dud adult iżda b'kwalunkwe fosdqiet li ġew prodotti). Il-ħamrija mbagħad tiġi inkubata għal erba' ġimgħat oħra fl-istess kundizzjonijiet tat-test ħlief li t-tagħlif isir biss darba fil-bidu ta' din il-fażi tat-test (ara l-paragrafu 33).

39. Fi tmiem it-tieni perjodu ta' 4 ġimgħat, in-numru ta' fireħ li jfaqqsu mill-fosdqiet fil-ħamrija tat-test u n-numru ta' fosdqiet jiġi ddeterminat permezz tal-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 5. Is-sinjali kollha ta' dannu jew ħsara lid-dudu għandhom jiġu rreġistrati wkoll matul il-perjodu tal-ittestjar kollu.

Test tal-limitu

40. Jekk ma jiġu osservati ebda effetti fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jitwettaq bħala test tal-limitu, permezz ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg. Test tal-limitu sejjer jipprovdi l-opportunità biex juri li l-NOEC għar-riproduzzjoni hija ikbar mill-konċentrazzjoni tal-limitu filwaqt li jitnaqqas in-numru ta' dud użat fit-test. Għandhom jintużaw tmien repliki kemm għall-ħamrija ttrattata kif ukoll il-kontroll.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

41. Għalkemm tingħata ħarsa ġenerali fl-Appendiċi 6, ma tingħata ebda gwida statistika definittiva għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar f'dan il-metodu ta' ttestjar.

42. Punt ta' tmiem minnhom huwa l-mortalità. Il-bidliet fl-imġiba (eż. l-inabbiltà biex titħaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjħu mal-ħajt tal-ħġieġ tar-reċipjent tat-test) u l-morfoloġija (eż. l-preżenza ta' feriti miftuħa) tad-dud adult għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieħ. L-analiżi probit (18) jew ir-rigressjoni loġistika għandhom normalment jiġu applikati biex tiġi ddeterminata l-LC_{50}. Madankollu, f'każijiet fejn dan il-metodu ta' analiżi mhuwiex xieraq (eż. jekk inqas minn tliet konċentrazzjonijiet bi qtil parzjali huma disponibbli), jistgħu jintużaw metodi alternattivi. Dawn il-metodi jistgħu jinkludu ċ-ċaqliq tal-medji (19), il-metodu Spearman-Karber trimmjat (20) jew interpolazzjoni sempliċi (eż. medja ġeometrika ta' LC_0 u LC_{100}, kif ikkalkolat mill-għerq kwadrat ta' LC_0 immoltiplikat b'LC_{100}).

43. Il-punt ta' tmiem l-ieħor hija l-fekondità (eż. numru ta' frieħ prodotti). Madankollu, bħal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' dannu l-oħra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll. L-analiżi statistika titlob il-medja aritmetika $\bar{x}$ u d-devjazzjoni standard għal kull trattament u għal kull kontroll għar-riproduzzjoni biex tkun ikkalkolata.

44. Jekk titwettaq analiżi tal-varjanza, id-devjazzjoni standard, s, u l-gradi ta' libertà (df) jistgħu jiġu sostitwiti mill-istima miksuba mill-varjanza raggruppata miksuba mill-ANOVA u l-gradi tiegħu ta' libertà, rispettivament — sakemm il-varjanza ma tiddependix fuq il-konċentrazzjoni. F'dan il-każ, uża l-varjanzi uniċi tal-kontroll u t-trattamenti. Dawn il-valuri huma ġeneralment ikkalkolati minn softwer statistiku kummerċjali permezz ta' riżultati għal kull reċipjent bħala repliki. Jekk ir-raggruppar tad-dejta għall-kontrolli tas-solventi jidher raġonevoli iktar mill-ittestjar ma' wieħed minn dawk, dawn għandhom jiġu ttestjati biex jiġi osservat jekk sinifikament differenti (għat-testijiet xierqa, ikkunsidra paragrafu 47 u l-Appendiċi 6).

45. Testjar u inferenza statistika ulterjuri tiddependi fuq jekk il-valuri tar-repliki humiex normalment distribwiti u humiex omoġenji fir-rigward tal-varjanza tagħhom.

▼M6

Stima tal-NOEC

46. L-applikazzjoni ta' testijiet qawwija għandha tiġi ppreferuta. Wieħed għandu juża informazzjoni eż. minn esperjenza preċedenti b'ring testing jew dejta storika oħra dwar jekk id-dejta storika hijiex distribwita b'mod approssimativ normali. L-omoġeneità tal-varjanza (omossedastiċità) hija iktar kritika. L-esperjenza tgħid li l-varjanza ħafna drabi tiżdied meta tiżdied il-medja. F'dawn il-każijiet, trasformazzjoni tad-dejta tista' twassal għal omossedastiċità. Madankollu, tali trasformazzjoni għandha tkun ibbażata fuq l-esperjenza b'dejta storika iktar milli dejta li tkun qiegħda tiġi investigata. B'dejta omoġenja, għandhom jitwettqu testijiet t multipli bħat-test ta' Williams (α = 0,05, naħa waħda) (21)(22) jew f'ċerti każijiet, it-test ta' Dunnett (23)(24). Għandu jiġi nnotat li, fil-każ ta' replikazzjoni mhux indaqs, il-valuri-t tat-tabella għandhom jiġu korretti kif issuġġerit minn Dunnett u Williams. Xi drabi, minħabba varjazzjoni kbira, ir-risponsi ma jiżdidux/jonqsux b'mod regolari. F'dan il-każ ta' devjazzjoni qawwija mill-monotoniċità, it-test ta' Dunnett huwa iktar xieraq. Jekk hemm devjazzjonijiet mill-omossedastiċità, jaf ikun raġonevoli li jiġu investigati l-effetti possibbli fuq il-varjanzi iktar mill-qrib biex jiġi deċiż jekk it-testijiet-t jistgħux jiġu applikati mingħajr it-telf ta' ħafna qawwa (25). Inkella, test-U multiplu, it-test-U ta' Bonferroni skont Holm, (26), jew meta din id-dejta tesebixxi omossedastiċità iżda hija altrimenti konsistenti ma' rispons għad-doża monotonu sottostanti, test mhux parametriku ieħor [eż. Jonckheere--Terpstra (27)(28) jew Shirley (29) (30)) jistgħu jiġu applikati u ġeneralment ikunu ppreferuti minn testijiet-t b'varjanza inugwali. (ara wkoll l-iskema fl-Appendiċi 6).

47. Jekk ikun twettaq test tal-limitu u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametriċi (normalità, omoġenità), jista' jintuża t-test-t tal-Istudent parallel jew inkella l-proċedura ta' test-U ta' Mann-Whitney (31).

Estimi ta' EC_x

48. Biex jiġi kkalkolat kwalunkwe valur EC_x, jintużaw il-medji għal kull trattament għall-analiżi tar-rigressjoni (lineari jew mhux lineari), wara li tkun inkisbet funzjoni ta' rispons/doża xierqa. Għat-tkabbir tad-dud bħala rispons kontinwu, il-valuri EC_x- jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (32). Fost il-funzjonijiet xierqa għal dejta kwantali (mortalità/sopravivenza u numru ta' wild prodotti), huma l-funzjonijiet sigmoid, loġistiċi jew Weibull, li fihom tnejn sa erba' parametri, li xi wħud minnhom jistgħu jimmudellaw ukoll ir-risponsi ormetriċi. Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża ddaħħlet b'analiżi tar-rigressjoni lineari, għandha tinstab r^2 sinifikanti (koeffiċjent ta' determinazzjoni) u/jew gradjent bl-analiżi tar-rigressjoni qabel l-istima tal-EC_x billi jiddaħħal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba b'analiżi tar-rigressjoni. limiti ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati skont il-metodu ta' Fieller (iċċitat f'Finney f'18)) jew metodi xierqa moderni oħra.

49. Inkella, ir-rispons jiġi mmudellat bħala perċentwali jew proporzjon tal-parametru ta' mudell li huwa interpretat bħala r-rispons tal-medja ta' kontroll. F'dawn il-każijiet, il-kurva sigmojd (loġistika, ta' Weibull) normali ħafna drabi malajr tista' tiddaħħal fir-riżultati permezz ta' proċedura ta' rigressjoni probit (18). F'dawn il-każijiet, il-funzjoni ta' ppeżar għandha tiġi aġġustata għal risponsi metriċi kif mogħti minn Christensen (33). Madankollu, jekk tkun osservata ormeżi, l-analiżi probit għandha tiġi sostitwita minn funzjoni loġistika jew ta' Weibull b'erba' parametri, imdaħħla minn proċedura ta' rigressjoni mhux lineari (34). Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża xierqa ma tistax tiddaħħal mad-dejta, wieħed jista' juża metodi alternattivi biex tiġi stmata l-EC_x, u l-limiti tal-kunfidenza tagħha, bħall-Moving Averages wara l-proċedura Thompson (19) u l-proċedura Spearman-Karber Trimmjata (20).

RAPPORT TAT-TEST

50. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼M6

Sustanza kimika tat-test:

— deskrizzjoni definittiva tas-sustanza kimika tat-test, in-numru tal-lott u CAS, il-purità;

— il-proprjetajiet tas-sustanza kimika tat-test (eż. log Kow, is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-kostant ta' Henry (H) u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba).

Organiżmi tat-test:

— l-annimali tat-test użati: l-ispeċi, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organiżmi u l-kundizzjonijiet tat-tgħammir;

— l-età, il-medda tad-daqs (massa) tal-organiżmi tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

— dettalji tal-preparazzjoni għall-ħamrija tat-test;

— il-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija;

— deskrizzjoni tat-teknika użata biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test lill-ħamrija;

— dettalji tas-sustanzi kimiċi awżiljari użati għall-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji tal-kalibrazzjoni għat-tagħmir tal-isprejjar, jekk ikun xieraq;

— deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura sperimentali;

— id-daqs tal-kontenituri u l-volum tal-ħamrija tat-test;

— kundizzjonijiet tat-test: intensità tad-dawl, durata taċ-ċikli tad-dawl u d-dlam, it-temperatura;

— deskizzjoni tar-reġim ta' tagħlif, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati ta' tagħlif;

— il-pH u l-kontenut tal-ilma tal-ħamrija fil-bida u fi tmiem it-test.

Riżultati tat-test:

— il-mortalità tal-adulti (%) f'kull kontenitur tat-test fi tmiem l-ewwel 4 ġimgħat tat-test;

— il-massa totali ta' adulti fil-bidu tat-test f'kull kontenitur tat-test;

— il-bidliet fil-piż tal-ġisem tal-adulti ħajjin (% tal-piż inizjali) f'kull kontenitur tat-test wara l-ewwel erba' ġimgħat tat-test;

— in-numru ta' frieħ prodotti f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;

— deskrizzjoni tas-sintomi ovvji u patoloġiċi jew bidliet distinti fl-imġiba;

— ir-riżultati miksuba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;

— l-LC_{50}, l-NOEC u/jew l-EC_x (eż. EC_{50}, EC_{10}) għar-riproduzzjoni jekk xi wħud minnhom ikunu applikabbli b'intervalli ta' kunfidenza, u graff tal-mudell imdaħħal għall-kalkolu tiegħu, l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati;

— plott tar-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons;

— ir-riżultati applikabbli għal kull kontenitur tat-test;

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

(1) Jaenicke, J. (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 — 282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Test tat-tossiċità akutatal-ħniex.

(5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

(13) (ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

EC_x (Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organiżmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit. F'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet tal-effett huma espressi bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-ħamrija.

LC_0 (L-ebda konċentrazzjoni letali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li ma toqtolx xi wieħed mill-organiżmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_0 hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LC_{50} (Konċentrazzjoni letali medja) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 50 % tal-organiżmi tat-test esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_{50} hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-ħamrija.

LC_{100} (Konċentrazzjoni letali totali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 100 % tal-organiżmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_{100} hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LOEC (Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) F'dan it-test, l-LOEC hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-ħamrija. Il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandhom normalment juru effett li huwa statistikament differenti mill-kontroll. Kwalunkwe devjazzjoni minn dan ta' hawn fuq għandha tiġi ġġustifikata fir-rapport tat-test.

NOEC (Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test eżattament taħt l-LOEC fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Rata tar-riproduzzjoni: Numru medju ta' dud frieħ prodott għal numru ta' adulti matul il-perjodu tat-test.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼**M6**

Appendiċi 2

Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija nstab li huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (1).

Iġbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-ħamrija tal-ittestjar permezz ta' apparat ta' kampjunar xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru mimlija bl-ilma u mbagħad qegħeda fuq xtelliera f'banjumarija. It-tubu għandu jiddaħħal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-ħamrija. Imbagħad għandu jitħalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-ħamrija jista' jinżamm, il-kampjun tal-ħamrija għandu jitħalla jitbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpoġġi t-tubu fuq saff ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq, imxarrab ħafna ġewwa reċipjent mgħotti (biex jiġi evitat li jinxef). Il-kampjun għandu mbagħad jintiżen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f′ \% ta′ massa xotta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

REFERENZI:

(1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Appendiċi 3

Determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO DIS 10390: Kwalità tal-Ħamrija — Determinazzjoni tal-pH (1).

Kwantità ddefinita ta' ħamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-ħamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' ħamrija) f'ħames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku ($CaCl_2$). Is-sospensjoni mbagħad titħallat sew għal ħames minuti u mbagħad titħalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Imbagħad il-pH tal-fażi likwida titkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

REFERENZI:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼**M6**

Appendiċi 4

Kulturi ta' Eisenia fetida /Eisenia andrei

It-tnissil għandu preferibbilment isir f'kompartiment klimatiku f'20 °C ± 2 °C. F'din it-temperatura u bl-għoti ta' biżżejjed ikel, id-dud jimmatura wara madwar xahrejn sa 3 xhur.

Iż-żewġ speċijiet jistgħu jiġu kkulturati f'firxa wiesgħa ta' skart tal-annimali. Il-midjum ta' tnissil rakkomandat huwa taħlita ta' 50:50 ta' demel u pit taż-żwiemel jew annimali tal-ifrat. Għandhom isiru verifiki biex jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel minn fejn jinkiseb id-demm mhumiex soġġetti għal mediċini jew trattament b'sustanzi kimiċi, bħalma huma promoturi tat-tkabbir, nematiċidi jew prodotti veterinarji simili li jistgħu jaffettwaw b'mod ħażin id-dud matul it-test. Huwa rakkomandat demel awtomiġbur minn sors "organiku", peress li l-esperjenza wriet li d-demel disponibbli fis-suq użat bħala fertilizzant fil-ġonna jaf ikollu effetti avversi fuq id-dud. Il-midjum għandu jkollu valur ta' pH ta' madwar 6 sa 7 (aġġustat bil-karbonat tal-kalċju), konduttività jonika baxxa (inqas minn 6 mS/cm jew 0,5 % konċentrazzjoni ta' melħ) u ma għandux ikun ikkontaminat b'mod eċċessiv b'ammonijaka jew awrina tal-annimali. Is-sottostrat għandu jkun umdu iżda mhux imxarrab wisq. Il-kaxex ta' tnissil ta' kapaċità ta' 10 sa 50 litru huma xierqa.

Biex jinkiseb dud ta' età u daqs standard (massa), l-aħjar huwa li l-kultura tinbeda b'fosdqiet. Ladarba tiġi stabbilita l-kultura, din tinżamm billi d-dud adult jitqiegħed f'kaxxa tat-tnissil b'sottostrat ġdid għal 14-il jum sa 28 jum biex ikunu jistgħu jiġu prodotti iktar fosdqiet. L-adulti mbagħad jitneħħew u d-dud frieħ prodott mill-fosdqiet jintuża bħala baži għall-kultura li jmiss. Id-dud jingħalef kontinwalment bi ħmieġ tal-annimali u jiġi ttrasferit f'sottostrat ġdid minn żmien għall-ieħor. L-esperjenza wriet li demel tal-baqar jew il-ħnieżer mitħun irqiq, imnixxef bl-arja jew il-ħafur huwa ikel xieraq. Għandu jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel li minnhom jinkiseb id-demel mhumiex soġġetti għal trattament mediku b'sustanzi kimiċi, bħal promoturi tat-tkabbir, li jistgħu jaffettwaw ħażin id-dud matul kultura b'terminu twil. Id-dud li jfaqqas minn fosdqiet jintuża għall-ittestjar meta jkollu bejn xahrejn u 12-il xahar u huwa kkunsidrat adult.

Id-dud jista' jiġi kkunsidrat b'saħħtu jekk jiċċaqlaq fis-sottostrat, ma jippruvax jitlaq is-sottostrat u jirriproduċi kontinwament. L-eżawriment tas-sottostrat huwa indikat minn dud li jiċċaqlaq bil-mod ħafna u li jkollu tarf ta' wara isfar. F'dan il-każ, huwa rakkomandat il-provvediment ta' sottostrat ġdid u/jew tnaqqis fid-densità tal-ħażna.

▼M6

Appendiċi 5

Tekniki għall-għadd ta' dud frieħ imfaqqas minn fosdqiet

It-tqassim bl-idejn ta' dud mis-sottostrat tal-ħamrija jieħu ħafna ħin. Għalhekk huma rakkomandati żewġ metodi alternattivi:

(a) Il-kontenituri tat-test jitqiegħdu f'banjumarija inizjalment f'temperatura ta' 40 °C li iżda titla' għal 60 °C. Wara perjodu ta' madwar 20 minuta, id-dud frieħ għandu jidher f'wiċċ il-ħamrija minn fejn jista' jitneħħa u jingħadd faċilment.

(b) Il-ħamrija tal-ittestjar jista' jinħasel billi jingħadda minn passatur permezz tal-metodu żviluppat minn van Gestel et al. (1) sakemm il-pit u d-demel jew il-ħafur miżjud mal-ħamrija kienu mitħuna għal trab irqiq. Żewġ passaturi b'daqs tax-xibka ta' 0,5 mm (dijametru ta' 30 cm) jitqiegħdu fuq xulxin. Il-kontenut tal-kontenitur tat-test jinħasel permezz tal-passaturi bi fluss qawwi ta' ilma tal-vit, u dan iħalli d-dud u l-fosdqiet żgħar fil-biċċa l-kbira tagħhom fil-passatur ta' fuq. Huwa importanti li jiġi nnotat li l-wiċċ ġdid tal-passatur ta' fuq jinżamm imxarrab matul din l-operazzjoni biex b'hekk id-dud frieħ iżomm f'wiċċ kisja ta' ilma, u b'hekk jiġi evitat li jgħaddi mill-pori tal-passatur. L-aqwa riżultati jinkisbu meta tintuża doċċja.

Ladarba s-sottostrat tal-ħamrija kollu jkun inħasel permezz tal-passatur, il-frieħ u l-fosdqiet jistgħu jitlaħalħu mill-passatur għal skutella. Il-kontenut tal-iskutella mbagħad jitħalla joqgħod biex b'hekk il-fosqdiet il-vojta jkunu jistgħu jżommu f'wiċċ l-ilma u l-fosqdiet sħaħ u d-dud żgħir ikun jista' jibqa' niżel s'isfel. L-ilma tal-wiċċ imbagħad jista' jitneħħa u d-dud u l-fosdqiet iż-żgħar jiġu ttrasferiti f'dixx petri li fih naqra ilma. Id-dud jista' jitneħħa għall-għadd permezz ta' labra jew par pinzetti.

L-esperjenza wriet li l-metodu (a) huwa iktar adattat għall-estrazzjoni ta' dud frieħ li jista' jitlaħlaħ anki permezz ta' passatur ta' 0,5 mm.

Għandha dejjem tiġi ddeterminata l-effiċjenza tal-metodu użat biex jitneħħa d-dud (u l-fosdqiet jekk ikun xieraq) mis-sottostrat tal-ħamrija. Jekk il-frieħ jinġabru permezz tat-teknika tal-issortjar bl-idejn, huwa rakkomandat li l-operazzjoni titwettaq darbtejn fuq il-kampjuni kollha.

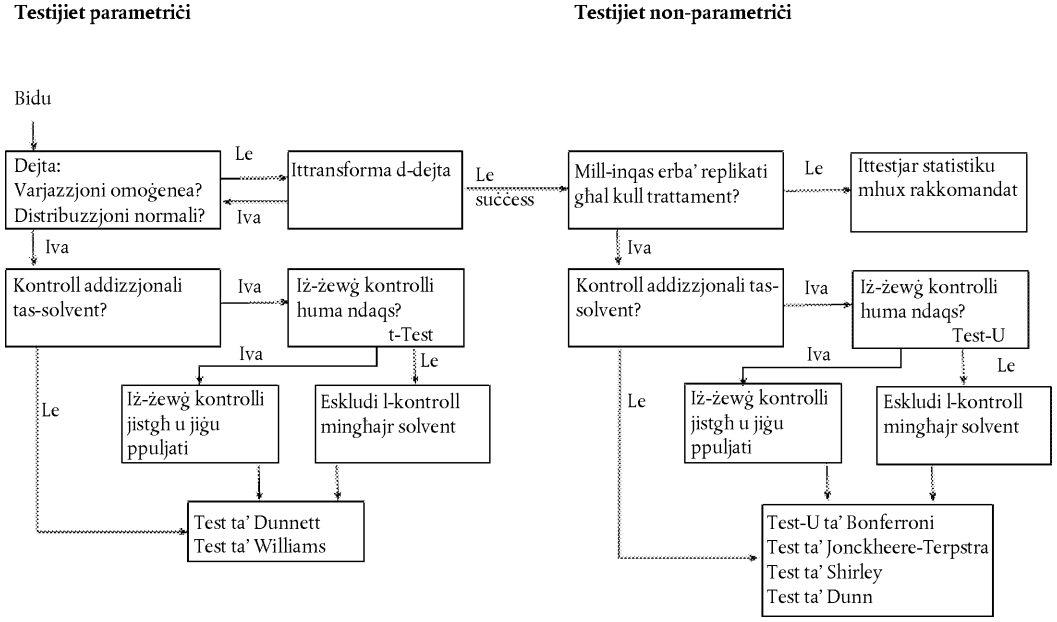
REFERENZI:

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

Appendiċi 6

Harsa ġenerali lejn il-valutazzjoni statistika tad-dejta (determinazzjoni tal-NOEC)



▼M6

C.34. **DETERMINAZZJONI TAL-INIBIZZJONI TAL-ATTIVITÀ TAL-BATTERJI ANAEROBIĊI — TNAQQIS FIL-PRODUZZJONI TAL-GASS MINN ĦAMA (DRENAĠĠ) B'DIĠESTJONI ANAEROBIKANTI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 224 tal-OECD (2007). Is-sustanzi kimiċi li jinħarġu fl-ambjent akkwatiku jgħaddu kemm miż-żoni aerobiċi u anaerobiċi, fejn jistgħu jiġu degradati u/jew jistgħu jinibixxu l-attività batterika; f'xi każijiet jistgħu jibqgħu f'żoni anaerobiċi mhux disturbati għal deċennji jew iktar. Fil-trattament tal-ilma mormi, l-ewwel stadju, l-abitat primarju, huwa ajrobiku fil-likwidu supernatanti u anaerobiku fil-ħama subnatanti. Dan huwa segwit fit-tieni stadju minn żona ajrobika fit-tank ta' arjazzjoni tal-ħama attivata u żona anaerobika fil-ħama tas-subnatanti fit-tank tas-soluzzjoni sekondarja. Il-ħama minn dawn iż-żewġ stadji ġeneralment hija soġġetta għal trattament anaerobiku li jipproduċi metan u dijossidu tal-karbonju li normalment jintużaw biex jipproduċu l-elettriku. Fl-ambjent usa', is-sustanzi kimiċi li jilħqu naqal f'bajjiet, f'estwarji u l-baħar x'aktarx jibqgħu f'dawn iż-żoni anaerobiċi indefinittivament jekk ma jkunux bijodegradabbli. Idealment, proporzjonijiet ikbar ta' xi wħud mis-sustanzi kimiċi sejrin jilħqu dawn iż-żoni minħabba l-proprjetajiet fiżiċi tagħhom, bħal solubbiltà baxxa fl-ilma, adsorbiment qawwi f'solidi sospiżi, kif ukoll l-inabbiltà li jiġu bijodegradati ajrobikament.

2. Filwaqt li huwa rakkomandabbli li s-sustanzi kimiċi li jinħelsu fl-ambjent għandhom ikunu bijodegradabbli kemm f'kundizzjonijiet ajrobiċi kif ukoll anaerobiċi, huwa essenzjali li tali sustanzi kimiċi ma jinibixxux l-attività ta' mikro-organiżmi f'xi żona minnhom. Fir-Renju Unit, kien hemm xi każijiet ta' inibizzjoni sħiħa tal-produzzjoni tal-metan ikkawżata minn, pereżempju, pentaklorofenol fl-iskariki industrijali, li jwassal għal trasport li jiswa ħafna flus ta' ħama inibita mid-diġesturi lejn siti "sikuri" u l-importazzjoni ta' ħama b'diġestjoni tajba minn installazzjonijiet fil-qrib. Iżda kien hemm ħafna każijiet ta' tfixkil inqas sever tad-diġestjoni minn diversi sustanzi kimiċi oħrajn, inkluż aloidrokarburi alifatiċi (ħasil fix-xott) u deterġenti, li jwasslu għal indeboliment sinifikanti fl-effiċjenza tad-diġestur.

3. Metodu ta' ttestjar wieħed biss, C.11 (1), jittratta l-inibizzjoni tal-attività batterika (Respirazzjoni tal-ħama attivata), li jivvaluta l-effett tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq ir-rata ta' teħid tal-ossiġenu fil-preżenza tas-sottostrat. Il-metodu ntuża b'mod wiesgħa biex jagħti twissija bikrija ta' effetti dannużi possibbli ta' sustanzi kimiċi fuq it-trattament ajrobiku tal-ilmijiet mormija, kif ukoll l-indikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet mhux inibitorji tas-sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jintużaw fid-diversi testijiet għall-bijodegradabbiltà. Il-metodu ta' ttestjar C.43 (2) joffri opportunità limitata għad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test għall-produzzjoni tal-gass minn ħama anaerobika, imħallta ma' parti waħda minn għaxra mill-konċentrazzjoni normali tas-solidi għall-preċiżjoni meħtieġa fil-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà perċentwali. Peress li l-ħama dilwita tista' tkun iktar sensittiva għal sustanzi kimiċi inibitorji, il-grupp tal-ISO ddeċieda li jippreppara metodu li juża ħama mhux dilwita. Tal-inqas ġew eżaminati tliet testi (mid-Danimarka, il-Ġermanja u r-Renju Unit) u fl-aħħar nett ġew ippeparati żewġ standards tal-ISO, wieħed permezz ta' ħama mhux dilwita, ISO 13 641-1 (3) u l-ieħor permezz ta' ħama dilwita f'mitt parti, ISO 13 641-2 (4), biex jiġu rrappreżentati t-tajn u n-naqal li jkollhom popolazzjonijiet ta' batterji baxxi. Iż-żewġ metodi kienu soġġetti għal ring test (5); parti 1 kienet ikkonfermata bħala standard aċċettabbli iżda kien hemm nuqqas ta' qbil dwar il-parti 2. Ir-Renju Unit ikkunsidra li, peress li parti sinifikanti mill-parteċipanti ma rrapportaw ebda produzzjoni ta' gass jew ftit li xejn, parzjalment minħabba li l-ispazju perċentwali tal-gass kien għoli ħafna (f'75 %) għall-aħjar sensittività, il-metodu jeħtieġ iktar investigazzjoni.

4. Ħidma iktar bikrija fir-Renju Unit (6)(7) iddeskriviet metodu manometriku permezz ta' ħama ta' diġestjoni mhux dilwita, flimkien ma' ħama minn drenaġġ mhux ipproċessat, fi flasks ta' 500 ml; l-apparat kien ineffiċjenti u l-intiena tal-ħama mhux ipproċessata kienet qawwija. Iktar tard Wilson et al. applika b'suċċess l-apparat iktar kompatt u konvenjenti ta' Shelton and

▼M6

Tiedje (8) kif żviluppat minn Battersby and Wilson (9). (10). Kawahara et al (11) ipprepara b'suċċess iktar ħama standard fil-laboratorju għall-użu f'testijiet għal bijodegradabbiltà anaerobika u l-inibizzjoni minn numru ta' sustanzi kimiċi. Barra minn hekk, il-ħama mhux ipproċessata bħala s-sottostrat kienet issostitwita biex jitwettaq test jew b'ħama anaerobika dilwita f'mitt parti jew b'tajn, naqal eċċ. ta' attività batterjali baxxa.

5. Dan il-metodu jista' jipprovdi informazzjoni li hija utli fit-tbassir tal-effett probabbli ta' sustanza kimika tat-test fuq il-produzzjoni tal-gass f'diġesturi anaerobiċi. Mandakollu, testijiet itwal biss li jissimulaw id-diġesturi operattivi iktar mill-qrib jistgħu jindikaw jekk jistax iseħħ l-adattament tal-mikroorganiżmi għas-sustanza kimika tat-test jew jekk sustanzi kimiċi li x'aktar jiġu adsorbiti u adsorbiti fil-ħama jistgħux jakkumulaw sa konċentrazzjoni tossika f'perjodu ta' żmien itwal milli permess f'dan it-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Alikwoti ta' taħlita ta' ħama ta' diġestjoni anaerobika (20 g/l sa 40 g/l tas-solidi totali) u soluzzjoni ta' sottostrat degradabbli huma inkubati waħedhom u simultanjament ma' firxa ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'reċipjenti ssiġillati sa 3 ijiem. L-ammont ta' gass (metan flimkien ma' dijossidu tal-karbonju) prodott jitkejjel biż-żieda fil-pressjoni (Pa) fil-fliexken. L-inibizzjoni perċentwali tal-produzzjoni ta' gass li jġibu magħhom id-diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test hija kkalkolata mill-ammonti prodotti fil-fliexken tat-test u ta' kontroll rispettivi. L-EC_{50} u konċentrazzjonijiet effettivi oħrajn jiġu kkalkolati minn plotts tal-inibizzjoni perċentwali mal-konċentrazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test jew, b'mod iktar komuni, il-logaritmu tagħha.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Is-sustanzi kimiċi tat-test normalment għandhom jintużaw fl-iktar forma pura li tkun faċilment disponibbli, peress li l-impuritajiet f'xi sustanzi kimiċi, eż. l-klorofenoli, jistgħu jkunu iktar tossiċi mis-sustanza kimika tat-test innifisha. Madankollu, għandhom jiġu kkunsidrati l-ħtiġijiet biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati fil-forma li jiġu prodotti/jitqiegħdu għad-dispożizzjoni fis-suq biha. L-użu ta' prodotti formulati mhuwiex normalment rakkomandat, iżda għal sustanzi kimiċi tat-test li ma tantx jinħallu, l-użu tal-materjal formulat jaf ikun xieraq. Il-proprjetajiet tas-sustanza kimika tat-test li għandhom ikunu disponibbli jinkludu s-solubbiltà fl-ilma u xi solventi organiċi, il-pressjoni tal-fwar, il-koeffiċjent ta' adsorbiment, l-idroliżi u l-bijodegradabbiltà f'kundizzjonijiet anaerobiċi.

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU

8. It-test huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi li jinħallu jew li ma jinħallux fl-ilma, inkluż sustanzi kimiċi volatili. Iżda attenzjoni speċjali hija meħtieġa b'materjali b'solubbiltà fl-ilma baxxa (ara ref. (12)) u ta' volatilità għolja. Barra minn hekk jistgħu jintużaw inokuli minn siti anaerobiċi oħrajn, eż. tajn, ħamriji saturati, naqal. Sistemi batteriċi anaerobiċi li preċedentement kienu ġew esposti għal sustanzi kimiċi tossiċi jistgħu jiġu adattati għaż-żamma tal-attività tagħhom fil-preżenza ta' sustanzi kimiċi ksenobijotiċi. Inokuli minn sistemi batteriċi adattati jaf juru tolleranza ikbar għas-sustanzi kimiċi tat-test meta mqabbla mal-inokuli miksuba minnn sistemi mhux adattati.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

9. Biex tiġi vverifikata l-proċedura, sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata billi jiġu kkonfigurati r-reċipjenti xierqa b'mod parallel bħala parti mit-twettiq ta' testijiet normali; 3, 5-diklorofenol intwera li huwa inibitur iktar konsistenti tal-produzzjoni tal-gass anaerobika, kif ukoll bħala konsum tal-ossiġenu mill-ħama attivata u reazzjonijiet bijokimiċi oħrajn. Żewġ sustanzi kimiċi oħrajn intwerew li huma iktar inibitorji għall-produzzjoni tal-metan milli 3, 5-diklorofenol, jiġifieri methylene bis-tjoċjanat u pentaklorofenol iżda r-riżultati bihom ma ġewx ivvalidati. Pentaklorofenol mhuwiex rakkomandat peress li mhuwiex faċilment disponibbli f'forma pura.

▼M6

RIPRODUĊIBBILTÀ TAR-RIŻULTATI

10. F'ring test internazzjonali (5) kien hemm biss riproduċibbiltà ġusta fil-valuri EC_{50} bejn l-10 laboratorji parteċipanti għal 3, 5-diklorofenol u l-aċidu sulfoniku 2-bromo-etan. (Il-medda tal-ewwel wieħed kienet 32 mg/l sa 502 mg/l u għal tal-aħħar 220-2 190 mg/l.)

Numru ta' laboratorji	Bħala mg/l			Bħala mg/g ta' ħama		
	medja	s.d.	cv(%)	medja	s.d.	cv(%)
	3, 5-Diklorofenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	Aċidu sulfoniku 2-Bromo-etan					
10	1 058	896	85	34	26	76

Dejta EC_{50} minn ring test — ħama mhux dilwita

11. Il-koeffiċjenti għoljin ta' varjazzjoni bejn il-laboratorji sa ċertu punt jirriflettu d-differenzi fis-sensittività tal-mikro-organiżmi minħabba espożizzjoni minn qabel jew l-ebda espożizzjoni minn qabel għas-sustanza kimika tat-test jew sustanzi kimiċi kimikament relatati oħra. Il-preċiżjoni b'liema l-valur EC_{50} abbażi tal-konċentrazzjoni tal-ħama kienet iddeterminata kienet ftit iktar aħjar mill-valur "volumetriku" (mg/l). It-tliet laboratorji li rrapportaw il-preċiżjoni tal-valuri EC_{50} tagħhom għal 3,5-diklorofenol urew koeffiċjenti ferm inqas ta' varjazzjoni (22, 9, u 18 % rispettivament għal EC_{50} mg/g) minn dawk tal-medji tal-għaxar laboratorji kollha. Il-medji individwali għat-tliet laboratorji kienu 3,1, 3,2 u 2,8 mg/g, rispettivament. Il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni iktar baxxi, aċċettabbli fi ħdan il-laboratorji meta mqabbel mal-koeffiċjenti ferm ogħla bejn il-valuri tal-laboratorju, jiġifieri 9-22 % cf. 92 %, jindikaw li hemm differenzi sinifikanti fil-proprjetajiet tal-ħama individwali.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

12. Huwa meħtieġ tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dan li ġej:

a) Inkubatur — li jiflaħ għall-isparks u kkontrollat fi 35 °C ± 2 °C;

b) Reċipjenti tal-ittestjar tal-ħġieġ reżistenti għall-pressjoni ta' daqs nominali xieraq (1), kull wieħed imdaħħal b'septum miksi li ma jgħaddix gass minnu, li jista' jiflaħ madwar 2 bar jew 2×10^5 Pa (għall-użu fil-kisi, eż. PTFE = politetrafluworeten). Il-fliexken tas-serum tal-ħġieġ b'volum nominali ta' 125 ml, b'volum reali ta' madwar 160 ml, issiġillati b'septa tas-serum (2) u huma rakkomandati ċrieki tal-aluminju rbattuti; iżda jistgħu jintużaw b'suċċess fliexken b'volum totali ta' bejn 0,1 u litru;

(1) Id-daqs rakkomandat huwa 0,1 litru għal litru.

(2) Huwa rakkomandat l-użu ta' septa tas-siliċju li ma jgħaddix gass minnhom. Huwa rakkomandat ukoll li l-impermeabbiltà għall-gass tal-għotjien, speċjalment is-septa tal-gomma tal-butil, tiġi ttestjata peress li diversi septa disponibbli fis-suq mhumiex impermeabbli biżżejjed għall-metan u xi septa ma jibqgħux impermeabbli meta jittaqqbu b'labra fil-kundizzjonijiet tat-test.

— Huma rakkomandati septa miksija li ma jgħaddix gass minnhom, li għandhom jintużaw għal sustanzi kimiċi volatili (xi septa kummerċjali huma relattivament irqaq, inqas minn 0,5 cm, u ma jibqgħux impermeabbli għall-gass wara li jittaqqbu b'labra ta' siringa);

— Huma rakkomandati septa tal-gomma tal-butil (madwar 1 cm), jekk is-sustanzi tat-test ma jkunux volatili (dawn normalment jibqgħu impermeabbli għall-gass wara li jittaqqbu.)

— Qabel it-test, huwa rakkomandat li s-septa jiġu eżaminati b'attenzjoni għall-abbiltà tagħhom biex jibqgħu impermeabbli għall-gass wara li jittaqqbu.

▼M6

c) Miter tal-pressjoni bi preċiżjoni ([1]) u twaħħil mal-labra

Il-produzzjoni totali tal-gass (metan flimkien ma' dijossidu tal-karbonju) titkejjel permezz ta' miter tal-pressjoni adattat biex jippermetti l-kejl u l-ivventjar tal-gass prodott. Eżempju ta' strument xieraq huwa miter tal-pressjoni bi preċiżjoni li jinżamm fl-idejn imqabbad ma' labra ta' siringa; valv impermeabbli tridirezzjonali jiffaċilita r-rilaxx ta' pressjoni żejda (Appendiċi 1). Huwa meħtieġ li l-volum intern tat-tubi u l-valv tat-transdjuser tal-pressjoni jinżamm baxx kemm jista' jkun, biex b'hekk l-iżbalji introdotti minħabba li jiġi ttraskurat il-volum tat-tagħmir ikunu insinifikanti;

d) Kontenituri iżolati, għat-trasport tal-ħama ta' diġestjoni;

e) Valvs għar-rilaxx tal-pressjoni tridirezzjonali;

f) Passatur, li għandu xibka kwadra ta' 1 mm;

g) Kontenitur, għall-ħama ta' diġestjoni, flixkun tal-ħġieġ jew ta' polietilen b'densità għolja, b'kapaċità ta' madwar 5 litri, mgħammar b'ħawwad u faċilitajiet biex jingħadda fluss ta' gass tan-nitroġenu (ara l-paragrafu 13) mill-ispazju fil-wiċċ;

h) filtri tal-membrana (0,2 μm) għall-isterilizzazzjoni tas-sottostrat;

i) mikro siringi, għall-konnessjoni impermeabbli għall-gass tat-transdjuser tal-pressjoni (ara l-paragrafu 12(c)) għall-ispazju fil-wiċċ tal-fliexken (ara l-paragrafu 12(b)); kif ukoll għaż-żieda ta' materjali tat-test b'likwidu li ma jinħallx fil-fliexken;

j) kompartiment tal-ingwanti, fakultattiv iżda rakkomandat, bi ftit pressjoni pożittiva tan-nitroġenu.

Reaġenti

13. Użа reaġenti tal-grad analitiku f'kull parti. Gass tan-nitroġenu, b'purità għolja b'kontenut ta' inqas minn 5 μl/l ta' ossiġenu, għandu jintuża f'kull parti.

Ilma

14. Jekk tkun meħtieġa dilwizzjoni f'xi stadju, uża ilma dejonizzat li kien qabel tneħħitlu l-arja minnu. Mhumiex meħtieġa kontrolli analitiċi, iżda kun żgur li l-apparat dejonizzanti jinżamm b'mod regolari. Uża ilma dejonizzanti anki għall-preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ewlenin. Qabel iż-żieda ta' inokulu anaerobiku ma' kwalunkwe soluzzjoni jew dilwizzjoni tal-materjal tat-test, kun żgur li dawn ikunu mingħajr ossiġenu. Dan isir jew billi jingħadda gass tan-nitroġenu fl-ilma ta' dilwizzjoni (jew fid-dilwizzjonijiet) għal siegħa qabel ma jiżdied l-inokulu, jew inkella billi jissaħħan l-ilma ta' dilwizzjoni sal-punt tat-togħlija u jitberred għat-temperatura tal-kamra f'atmosfera mingħajr ossiġenu.

Ħama Diġerita

15. Iġbor il-ħama ta' diġestjoni attiva minn diġestur f'impjant tat-trattament tal-ilma mormi, jew inkella, minn diġestur tal-laboratorju, billi tittratta l-ħamra minn drenaġġ prinċipalment domestiku. Informazzjoni prattika dwar il-ħama minn diġestur tal-laboratorju tista' tinstab x'imkien ieħor (11). Jekk ikun maħsub l-użu ta' inkolu adattat, tista' tiġi kkunsidrata d-diġestjoni tal-ħama minn impjant tat-trattament tad-drenaġġ industrijali. Uża fliexken b'għonq

([1]) Il-miter għandu jintuża u jiġi kkalibrat f'intervalli regolari, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Jekk jintuża miter tal-pressjoni tal-kwalità preskritta, eż. kkapsulat b'membrana tal-azzar, mhija meħtieġa ebda kalibrazzjoni fil-laboratorju. Dan għandu jiġi kkalibrat minn istitut illiċenzjat fl-intervalli rakkomandati. Il-preċiżjoni tal-kalibrazzjoni tista' tiġi vverifikata fil-laboratorju b'kejl f'punt partikolari f'1×10^5 Pa b'miter tal-pressjoni b'displej mekkaniku. Meta dan il-punt jitkejjel b'mod korrett, il-linearità sejra tibqa' l-istess ukoll. Jekk jintużaw apparati ta' kejl oħra (mingħajr kalibrazzjoni ċċertifikata mill-manifattur), hija rakkomandata konverżjoni tul il-medda totali f'intervalli regolari (Appendiċi 2).

▼M6

wiesgħa magħmula minn polietilen b'densità għolja jew materjal simili, li jista' jespandi, għall-ġbir tal-ħama. Żid il-ħama fil-fliexken tal-kampjun sa madwar 1 cm mill-parti ta' fuq nett tal-fliexken, issikkahom, preferibbilment b'valv tas-sigurtà (paragrafu 12(e)), u poġġihom f'kontenituri iżolati (paragrafu 12(d)) biex tnaqqas il-qabża fit-temperatura, sakemm ma jiġux ittrasferiti f'inkubatur 35 °C ± 2 °C. Meta titfaħ il-fliexken, ara li tħalli toħroġ il-pressjoni tal-gass żejda jew billi tiftaħ b'attenzjoni s-siġill, jew permezz ta' valv tar-rilaxx tal-pressjoni tridirezzjonali (paragrafu 12(e)). Huwa preferibbli li l-ħama tintuża fi żmien sagħtejn mill-ġbir, inkella tinħażen f'35 °C ± 2 °C fi spazju fil-wiċċ tan-nitroġenu għal sa 3 ijiem, meta normalment iseħħ ftit telf ta' attività.

Twissija — Id-diġestjoni tal-ħama tipproduċi gassijiet li jaqbdu li jippreżentaw riskji ta' nar u splużjoni: fiha wkoll organiżmi potenzjalment patoġeniċi, b'hekk hu prekawzjonijiet xierqa waqt l-immaniġġar tal-ħama. Għal raġunijiet ta' sigurtà, tużax reċipjenti tal-ħġieġ għall-ġbir tal-ħama.

Inokulu

16. Eżattament qabel l-użu, ħallat il-ħamrija billi tħawwadha u tgħaddiha minn passatur b'xibka ta' 1 mm^2 (paragrafu 12(f)) fi fliexkun xieraq (paragrafu 12(g)) mill-ispazju fil-wiċċ li minnu jingħadda fluss ta' nitroġenu. Warrab kampjun għall-kejl tal-konċentrazzjoni ta' solidi xotti totali (ara eż. ISO 11 923 (13) jew standard tal-UE ekwivalenti). B'mod ġenerali, uża l-ħama mingħajr dilwizzjoni. Il-konċentrazzjoni ta' solidi, ġeneralment tkun bejn 2 % u 4 % (w/v). Iċċekkja l-valur pH tal-ħama u, jekk ikun meħtieġ, aġġusta għal 7 ± 0,5.

Sottostrat tat-test

17. Ħoll 10 g brodu ta' nutrijenti (eż. Oxoid), 10 g ta' estratt tal-ħmira u 10 g ta' glukożju-D f'ilma dejonizzat u ddilwixxi sa 100 ml. Isterilizza b'filtrazzjoni permezz ta' filtru tal-membrana ta' 0,2 μm (paragrafu 12(h)) u uża minnufih u aħżen f'4 °C għal mhux iktar minn jum.

Sustanza kimika tat-test

18. Ipprepara soluzzjoni ewlenija għal kull sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma biex ikun fiha, pereżempju, 10 g/l tas-sustanza kimika f'ilma ta' dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14). Uża volumi xierqa ta' dawn is-soluzzjonijiet ewlenin biex tipprepara t-taħlitiet ta' reazzjoni li fihom konċentrazzjonijiet iggradati. Inkella, ipprepara serje ta' dilwizzjonijiet ta' kull soluzzjoni ewlenija biex b'hekk il-volum miżjud fil-fliexken ikun l-istess għal kull konċentrazzjoni finali meħtieġa. Il-pH tas-soluzzjonijiet ewlenin għandu jkun aġġustat għal 7 ± 0,2, jekk ikun meħtieġ.

19. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jinħallux biżżejjed fl-ilma, ikkonsulta ISO 10 634 (12) jew standard tal-UE ekwivalenti. Jekk ikun meħtieġ li jintuża solvent organiku, evita solventi bħal kloroform u tetraklorur tal-karbonju, li huma magħrufa sew li jinibixxu l-produzzjoni ta' metan. Ipprepara soluzzjoni ta' konċentrazzjoni xierqa ta' sustanza kimika li ma tinħallx fl-ilma f'solvent volatili xieraq, pereżempju, aċetun, dietileter. Żid il-volumi meħtieġa ta' soluzzjoni tas-solvent fil-fliexken tat-test vojta (paragrafu 12(b)) u evapora s-solvent qabel iż-żieda tal-ħama. Għal trattamenti oħra uża ISO 10 634 (12) jew standard tal-UE ekwivalenti, iżda oqgħod attent li kwalunkwe aġent tensjoattiv użat biex jiġu prodotti emulsjonijiet jista' jkun inibotorju għall-produzzjoni ta' gass anaerobiku. Huwa maħsub li l-preżenza ta' solventi organiċi u l-aġenti emulsifikanti tikkawża artefatti, is-sustanza kimika tat-test tista' tiżdied direttament mat-taħlita tal-ittestjar bħala trab jew likwidu. Is-sustanzi kimiċi volatili u s-sustanzi kimiċi tat-test b'likwidu li ma jinħallx fl-ilma jistgħu jiġu inokulati fi fliexken tas-serum, permezz ta' mikrosiringi (il-paragrafu 12(i)).

▼M6

20. Żid is-sustanzi kimiċi tat-test fil-fliexken biex tagħti serje ġeometrika ta' konċentrazzjonijiet, pereżempju, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l u 15,6 mg/l. Jekk il-medda ta' tossiċità ma tkunx magħrufa minn sustanzi kimiċi simili, l-ewwel wettaq test preliminari tas-sejba tal-medda b'konċentrazzjoni ta' 1 000 mg/l, 100 mg/l u 10 mg/l biex taċċerta l-medda xierqa.

Sustanza kimika ta' referenza

21. Ipprepara soluzzjoni milwiema ta' 3,5-diklorofenol (10 g/l) billi żżid gradwalment l-ammont minimu ta' 5 mol/l soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju mas-solidu, waqt li tħawwad, sakemm jinħall. Imbagħad żid ilma tad-dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14) sal-volum meħtieġ; is-sonikazzjoni tista' tgħin it-tidwib. Jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi ta' referenza oħra meta tkun inkisbet il-medda medja tal-EC_{50} f'tal-inqas tliet testijiet b'inokuli differenti (sorsi differenti jew ħinijiet differenti ta' ġbir).

INTERFERENZA/ŻBALJI

22. Xi kostitwenti ta' ħama jistgħu preżumibbilment jirreaġixxu ma' inibituri potenzjali jagħmluhom indisponibbli għal mikro-organiżmi sabiex jagħtu inibizzjoni iżgħar jew ebda inibizzjoni. Barra minn hekk, jekk il-ħama diġà kien fiha sustanza kimika li hija inibitorja, jistgħu jinkisbu riżultati żbaljati meta dik is-sustanza kimika kienet soġġetta għat-test. Apparti minn dawn il-possibbiltajiet, hemm numru ta' fatturi identifikati li jistgħu jwasslu għal riżultati foloz. Dawn huma elenkati fl-Appendiċi 3, flimkien mal-metodi li jeliminaw jew tal-inqas inaqqsu l-iżbalji.

PROĊEDURA TAT-TEST

23. In-numru ta' repliki meħtieġa jiddependi fuq il-grad ta' preċiżjoni meħtieġa għall-indiċijiet ta' inibizzjoni. Jekk is-siġilli tal-fliexken huma suffiċjentement impermeabbli matul it-test, ikkonfigura lott wieħed biss (tal-inqas triplikati) tal-fliexken tat-test f'kull konċentrazzjoni meħtieġa. Bl-istess mod, ikkonfigura lott wieħed ta' fliexken b'sustanza kimika ta' referenza u sett wieħed ta' kontrolli. Madankollu, jekk is-siġilli tal-fliexken iridu jittaqqbu darba jew xi ftit drabi biss, ikkonfigura lott (eż. triplikati) tal-fliexken tat-test għal kull intervall (t) li għalihom huma meħtieġa riżultati għall-konċentrazzjonijiet kollha ta' sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata. Bl-istess mod, ikkonfigura lottijiet "t" tal-fliexken għas-sustanza kimika ta' referenza u għall-kontrolli.

24. Huwa rakkomandat l-użu ta' kaxxa tal-ingwanti (paragrafu 12(j)). Tal-inqas 30 minuta qabel ma jinbeda t-test, ibda fluss ta' gass tan-nitroġenu mill-kaxxa tal-ingwanti li fiha t-tagħmir kollu meħtieġ. Assigura li t-temperatura tal-ħama hija fi ħdan 35 °C ± 2 °C matul l-immaniġġar u s-siġill tal-fliexken.

Test Preliminari

25. Jekk l-attività tal-ħama mhijiex magħrufa, huwa rakkomandat li jitwettaq test preliminari. Ikkonfigura l-kontrolli biex pereżempju, jagħtu konċentrazzjonijiet ta' solidi ta' 10 g/l, 20 g/l u 40 g/l, flimkien mas-sottostrat iżda ma jużaw ebda sustanza kimika tat-test. Barra minn hekk, uża volumi differenti ta' taħlita ta' reazzjoni sabiex ikollok tlieta sa erba' proporzjonijiet ta' volumi ta' spazju fil-wiċċ mal-volum tal-likwidu. Minn dawn ir-riżultati ta' volumi tal-gass prodotti f'diversi intervalli ta' żmien, il-kundizzjonijiet l-iktar xierqa li jippermettu żewġ kejliet kuljum li jipproduċu volumi sinifikanti ta' gass u jirrilaxxaw il-pressjoni kuljum fl-aqwa sensittività [1] mingħajr biża' ta' splużjonijiet.

Żieda ta' sustanzi kimiċi tat-test

26. Żid sustanzi kimiċi tat-test li jinħallu fl-ilma ma' fliexken tat-test vojta (paragrafu 12(b)) bħala soluzzjonijiet milwiema (paragrafu 18). Uża

[1] Dan japplika għall-konfigurazzjoni sperimentali u l-kundizzjonijiet sperimentali fejn il-volumi ta' gass prodotti — u minn inbjanki tal-kontroll u minn reċipjenti li jindikaw inibizzjoni ta' 70 — 80 % — jistgħu jiġu stmati b'marġini ta' żball aċċettabbli.

▼M6

tal-inqas settijiet ta' triplikati ta' fliexken għal kull medda ta' konċentrazzjonijiet (paragrafu 20). Fil-każ ta' sustanza kimika tat-test li ma tinħallx u li ma tantx tinħall, injetta soluzzjonijiet ta' dawn f'solventi organiċi permezz ta' mikrosiringa fi fliexken vojta biex tagħti settijiet ta' repliki ta' kull ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Evapora s-solvent billi tgħaddi ġett ta' gass tan-nitroġenu fuq wiċċ is-soluzzjonijiet fil-fliexken tat-test. Inkella, żid sustanzi kimiċi solidi li ma jinħallux bħala ammonti mwieżna tas-solidu direttament mal-fliexken tat-test.

27. Jekk sustanzi kimiċi tat-test ta' likwidu ma jinħallux u li ma tantx jinħall fl-ilma ma jiżdidux ma' solvent, żidhom direttament b'mikrosiringa mal-fliexken tat-test wara li żżid l-inokulu u s-sottostrat tat-test (ara l-paragrafu 30). Is-sustanzi kimiċi tat-test volatili jistgħu jiżdiedu bl-istess mod.

Żieda ta' inokulu u sottostrat

28. Ħawwad volum xieraq ta' ħama ta' diġestjoni mgħoddija minn passatur (ara l-paragrafu 16) fi fliexkun ta' 5 litri (il-paragrafu 12(g)), filwaqt li tgħaddi fluss ta' gass tan-nitroġenu mill-ispazju fil-wiċċ. Laħlaħ il-fliexken tat-test, li fihom soluzzjonijiet milwiema jew soluzzjonijiet ta' solvent evaporati tas-sustanzi kimiċi tat-test, bi fluss ta' gass tan-nitroġenu, għal madwar żewġ minuti biex tneħħi l-arja. Ferra' l-alikwoti, eż. 100 ml, tal-ħama imħallta sew fil-fliexken tat-test permezz ta' pipetta b'ponta kbira jew ċilindru tal-kejl. Huwa essenzjali li timla l-pipetta f'pass wieħed sal-volum eżatt ta' ħama meħtieġa minħabba l-faċilità li biha s-solidi tal-ħama joqogħdu f'posthom. Jekk jittieħed ammont ikbar, battal il-pipetta u erġa' ibda.

29. Imbagħad żid soluzzjoni ta' sottostrat suffiċjenti (paragrafu 17) biex tagħti konċentrazzjoni ta' 2 g/l ta' kull brodu ta' nutrijenti, estratt tal-ħmira u glukożju-D fit-taħlita, filwaqt li n-nitroġenu jkun għadu qiegħed jitferra'. Dan li ġej huwa eżempju għal-lottijiet tal-ittestjar.

Konċentrazzjoni tal-massa finali tas-sustanza kimika tat-test fil-fliexken tat-test (mg/L)	Volum ta' sustanza kimika tat-test (ml)		Reaġenti u midjums (ml)		
	Soluzzjoni ewlenija a) 10 g/l para. 18	Soluzzjoni ewlenija b) 1 g/l para. 18	Ilma ta' dilwizzjoni para. 14	Inokulu para. 16	Sottostrat para. 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Volum totali tal-fliexkun = 160 ml. Volum tal-likwidu = 103 ml
Volum tal-gass = 57 ml, jew 35,6 % tal-volum totali.

30. Bl-istess mod aħsel b'gass tan-nitroġenu, fliexken tat-test vojta biżżejjed biex tindirizza kwalunkwe sustanza kimika tat-test ta' likwidu volatili u li ma jinħallx (ara l-paragrafu 27).

▼M6

Kontrolli u sustanza kimika ta' referenza

31. Ikkonfigura tal-inqas settijiet triplikati ta' fliexken, li fihom ħama u sottostrat biss, biex jaġixxu bħala kontrolli. Ikkonfigura wkoll fliexken ta' repliki li fihom ħama u sottostrat flimkien ma' biżżejjed soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika ta' referenza 3,5-diklorofenol (paragrafu 21) biex tirriżulta f'konċentrazzjoni finali ta' 150 mg/l. Din il-konċentrazzjoni għandha tinibixxi l-produzzjoni ta' gass b'madwar 50 %. Inkella, ikkonfigura medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika ta' referenza. Barra minn hekk, ikkonfigura erba' fliexken żejda għall-kejl tal-pH li fihom ħama, ilma mingħajr ossiġenu u sottostrat. Żid is-sustanza kimika tat-test maż-żewġ fliexken fl-ogħla konċentrazzjoni li tkun qiegħda tiġi ttestjata u żid ilma mingħajr ossiġenu maż-żewġ fliexken li jifdal.

32. Assigura li l-fliexken kollha — is-sustanzi kimiċi tat-test u ta' referenza u l-kontrolli fihom l-istess volum (V_R) ta' likwidu; fejn ikun meħtieġ, żid ilma mingħajr ossiġenu (paragrafu 14) biex tagħmel il-volum. L-ispażju fil-wiċċ għandu jkun bejn 10 % u 40 % tal-volum tal-flixkun, il-valur attwali jintgħażel mid-dejta miksuba mit-test preliminari. Wara li żżid il-kostitwenti kollha fil-fliexken, neħħi l-labra li tforni l-gass u ssiġilla kull flixkun b'tapp tal-gomma u għatu tal-aluminju (Paragrafu 12(b)), filwaqt li xxarrab it-tapp b'taqtira ta' ilma dejonizzat biex tiffaċilita d-dħul. Ħawwad il-kontenut ta' kull flixkun billi tħawdu.

Inkubazzjoni tal-fliexken

33. Ittrasferixxi l-fliexken lejn l-inkubatur ikkontrollat b'termostat, preferibbilment mgħammar b'xejker, u miżmum f'35 °C ± 2 °C. Il-fliexken huma inkubati fid-dlam. Wara madwar siegħa, ekwilizza l-pressjoni fil-fliexken sat-temperatura tal-atmosfera billi ddaħħal il-labra tas-siringa, imwaħħla mal-miter tal-pressjoni (paragrafu 12(c)), mis-siġill ta' kull flixkun, wara iftaħ il-valv sakemm il-miter tal-pressjoni jaqra żero u fl-aħħar agħlaq il-valv. Il-labra għandha tiddaħħal f'angolu ta' madwar 45° biex tevita tnixxija ta' gass mill-fliexken. Jekk il-fliexken jiġu inkubati mingħajr xejker, ħawwad manwalment darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' inkubazzjoni totali biex tiġi ekwilibrata s-sistema. Inkuba l-fliexken u aqlibhom biex tevita kwalunkwe telf ta' gass mis-septum. Madankollu, il-qlib mhuwiex xieraq f'każijiet fejn is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jinħallux jistgħu jeħlu ma' qiegħ il-flask.

Ġestjoni tal-pressjoni

34. Meta l-fliexken jilħqu 35 °C ± 2 °C, kejjel u rreġistra l-pH tal-kontenut ta' tnejn minn erba' fliexken ikkonfigurati għal dan il-għan u armi l-kontenut; kompli inkuba l-fliexken li jifdal fid-dlam. Kejjel u rreġistra l-pressjoni fil-fliexken darbtejn kuljum fl-48 siegħa sat-72 siegħa ta' wara billi ddaħħal il-labra tal-miter tal-pressjoni mis-siġill ta' kull flixkun, wara nixxef il-labra bejn il-kejliet. Żomm il-partijiet kollha tal-fliexken fit-temperatura ta' inkubazzjoni matul il-kejl, li għandu jittieħed malajr kemm jista' jkun. Ħalli l-qari tal-pressjoni jistabbilizza u rreġistrah. Imbagħad iftaħ il-valv għal ventilazzjoni u agħlqu meta l-pressjoni taqra żero. Kompli t-test ġeneralment għal 48 siegħa mill-ħin tal-ewwel ekwalizzazzjoni tal-pressjoni, "ħin 0" iddisinjat. In-numru ta' qari u ventilazzjonijiet għandu jkun limitat għal sustanzi kimiċi volatili għal wieħed (fi tmiem l-inkubazzjoni) jew tnejn biex jiġi minimizzat it-telf ta' sustanza kimika tat-test (10).

35. Jekk il-qari tal-pressjoni jkun negattiv, tiftaħx il-valv. Kultant takkumula umdità fil-labra tas-siringa u t-tubi, indikata minn qari tal-pressjoni ftit negattiv. F'dan il-każ neħħi l-labra, ħawwad it-tubi, nixxef b'karta assorbenti u waħħal labra ġdida.

Kejl tal-pH

36. Kejjel u rreġistra l-pH tal-kontenut ta' kull flixkun wara l-kejl finali tal-pressjoni.

▼M6

DEJTA U RAPPORTAR

Espressjoni tar-riżultati

37. Ikkalkola t-total u l-medja tal-pressjonijiet irreġistrati f'kull intervall ta' żmien għal kull sett ta' fliexken ta' repliki u kkalkola l-medja grossa kumulattiva tal-pressjoni tal-gass f'kull intervall ta' żmien għal kull sett ta' repliki. Ipplottja kurvi tal-medja kumulattiva ta' produzzjoni tal-gass (Pa) mal-ħin għall-kontroll, il-fliexken tat-test u ta' referenza. Agħżel ħin fuq il-parti lineari tal-kurva, ġeneralment 48 siegħa, u kkalkola l-inibizzjoni perċentwali (I) għal kull konċentrazzjoni mill-ekwazzjoni [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

fejn

I inibizzjoni perċentwali, f' %;

P_t il-pressjoni tal-gass prodotta b'materjal tat-test f'ħin magħżul, f'Pascal (Pa);

P_c il-pressjoni tal-gass prodotta b'materjal tat-test fl-istess ħin, f'Pascal (Pa).

Jaf ikun rakkomandabbli li ż-żewġ plotts, jiġifieri Plott I jiddaħħlu mal-konċentrazzjoni u anki mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni biex b'hekk tintgħażel il-kurva li hija eqreb mal-linearità. Ivvaluta l-valur EC_{50} (mg/l) viżwalment jew b'analiżi tar-rigressjoni mill-kurva eqreb tal-linearità. Għal finijiet komparattivi, jaf ikun utli li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tiġi espressa bħala mg sustanza kimika/g tas-solidi xotta totali. Biex tikseb din il-konċentrazzjoni, aqsam il-konċentrazzjoni volumetrika (mg/l) bil-konċentrazzjoni volumetrika tas-solidi ta' ħama xotta (g/l) (paragrafu 16).

38. Ikkalkola l-inibizzjoni perċentwali milħuqa mill-konċentrazzjoni unika tas-sustanza kimika ta' referenza użata jew l-EC_{50} jekk ikun ġie investigat numru biżżejjed ta' konċentrazzjonijiet.

39. Ikkonverti l-pressjoni medja tal-gass prodott fil-kontroll P_c (Pa) għall-volum b'referenza għall-kurva ta' kalibrazzjoni tal-miter tal-pressjoni (Appendiċi 2) u minn dan ikkalkola l-produzzjoni ta' gass, espressa bħala l-volum prodott f'48 siegħa minn 100 ml ta' ħama mhux dilwita f'konċentrazzjonijiet ta' solidi ta' 2 % (20 g/l) sa 4 % (40 g/l).

Kriterji tal-validità

40. Riżultati mill-prova interlaboratorja tal-ISO (5) urew li s-sustanza kimika ta' referenza (3,5-diklorofenol) ikkawżat 50 % inibizzjoni tal-produzzjoni tal-gass f'medda ta' konċentrazzjonijiet ta' 32 mg/l sa 510 mg/l medja 153 mg/l (paragrafu 10). Din il-medda tant hija wiesgħa li ma jistgħux jiġu stabbiliti b'kunfidenzjalità limiti sodi għall-inibizzjoni bħala kriterji ta' validità; dan għandu jkun possibbli meta l-iżviluppi jkunu wrew kif għandhom jiġu prodotti inokuli iktar konsistenti. Il-volumi ta' gass prodott fil-fliexken ta' kontroll f'48 siegħa varjaw minn 21 ml/g ta' materja xotta ta' ħama sa 149 ml/g (medja ta' 72 ml/g). Ma kien hemm ebda relazzjoni ovvja bejn il-volum ta' gass prodott u l-valur EC_{50} korrispondenti. Il-pH finali varja bejn 6,1 u 7,5.

41. It-test huwa kkunsidrat bħala validu, meta tinkiseb inibizzjoni ta' iktar minn 20 % fil-kontroll ta' referenza li jkun fih 150 mg/l ta' 3,5-diklorofenol, iktar minn 50 ml gass għal kull gramma materja xotta jiġi prodott fil-kontroll inbjank u l-valur pH jaqa' fil-medda ta' 6,2 sa 7,5 fi tmiem it-test.

Rapport tat-Test

42. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test

— isem komuni, isem tas-sustanza kimika, numru CAS, formula strutturali u proprjetajiet fiżiko kimiċi rilevanti;

▼M6

— purità (impuritajiet) tas-sustanza kimika tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

— volumi ta' kontenut ta' likwidu u ta' spazju fil-wiċċ fir-reċipjenti tat-test;

— deskrizzjonijiet tar-reċipjenti tat-test u kejl tal-gass (eż. tip ta' miter ta' pressjoni);

— applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u sustanza kimika ta' referenza għas-sistema tat-test, il-konċentrazzjonijiet tat-test użati u l-użu ta' kwalunkwe solvent;

— dettalji tal-inokulu użat: isem l-impjant ta' trattament tad-drenaġġ, deskrizzjoni tas-sors tal-ilma mormi ttrattat (eż. temperatura operattiva, ħin ta' żamma tal-ħama, drenaġġ prinċipalment domestiku jew skart industrijali, eċċ.), konċentrazzjonijiet tas-solidi, attività ta' produzzjoni tal-gass ta' diġestur anaerobiku, espożizzjoni preċedenti jew adattament minn qabel possibbli għal sustanzi kimiċi tossiċi jew sit ta' ġbir tat-tajn, naqal eċċ;

— temperatura ta' inkubazzjoni u medda;

— numru ta' repliki.

Riżultati

— valuri tal-pH fi tmiem it-test;

— id-dejta kollha mkejla miġbura fir-reċipjenti ta' kontroll tas-sustanza kimika tat-test, ta' referenza u ta' inbjank, kif xieraq (eż. pressjoni f'Pa jew millibars) f'forma tabulari;

— inibizzjoni perċentwali fil-fliexken tat-test u ta' referenza, u l-kurvi ta' inibizzjoni/konċentrazzjoni;

— kalkolu tal-valuri EC_{50}, espress bħala mg/l u mg/g;

— produzzjoni tal-gass għal kull gramma ta' ħama fi 48 siegħa;

— raġunijiet għal kwalunkwe rifjut tar-riżultati tat-test;

— diskussjonijiet tar-riżultati, inkluż kwalunkwe devjazzjoni mill-proċeduri f'dan il-metodu ta' ttestjar u tiġi diskussa kwalunkwe devjazzjoni fir-riżultati tat-test minħabba l-interferenzi u l-iżbalji minn dak li jkun mistenni;

— jiġi indirizzat ukoll jekk il-fini ta' dan it-test kienx li jkejjel it-tossiċità għal mikro-organiżmi esposti minn qabel jew mhux esposti minn qabel.

LETTERATURA

(1) Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness: Ħama Attivata, Test tal-Inibizzjoni tar-Respirazzjoni.

(2) Kapitolu C.43 ta' dan l-Anness: Bijodegradabilità anaerobika tal-komposti organiċi fil-ħama diġerita: metodu ta' kejl tal-produzzjoni tal-gass.

(3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. INT Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

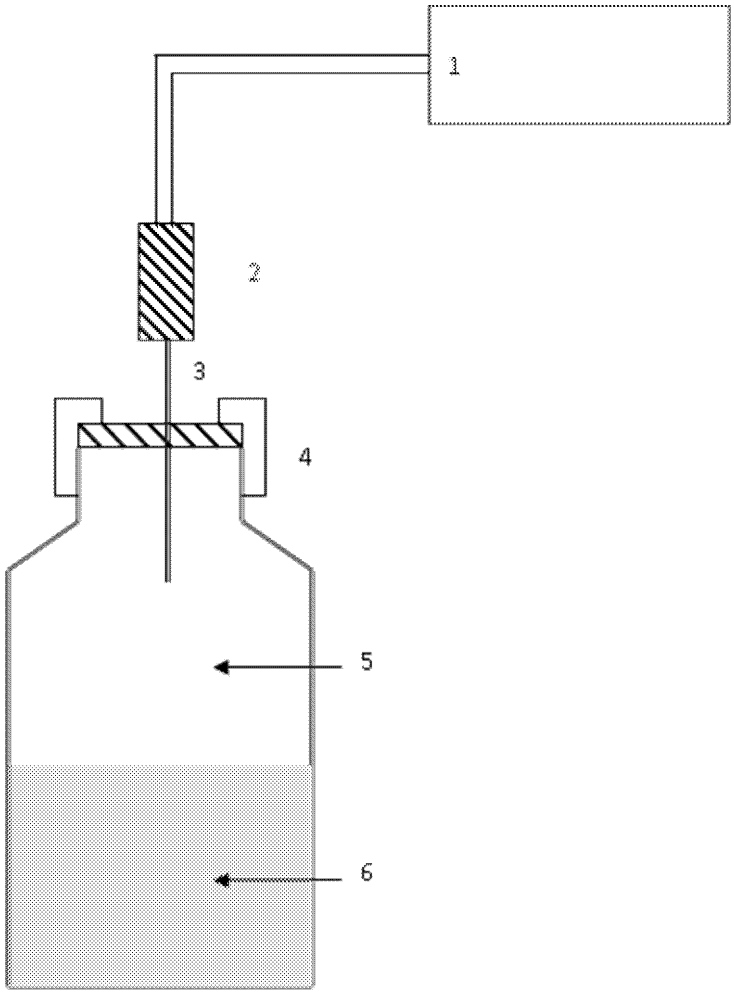
(12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Appendiċi 1

Eżempju ta' apparat biex titkejjel il-produzzjoni ta' bijogass skont il-pressjoni tal-gass



Spjega:

1 — Miter tal-pressjoni

2 — valv impermeabbli għall-gass b'żewġ direzzjonijiet jew tridirezzjonali

3 — Labra ta' siringa

4 — Siġill impermeabbli għall-gass (għatu kkrimpjat u septum)

5 — Spazju fil-wiċċ

6 — Inokulu ta' ħamrija diġerita

Reċipjenti tat-test f'ambjent ta' 35 °C ± 2 °C

▼M6

Appendiċi 2

Konverżjoni tal-miter tal-pressjoni

Il-qari tal-miter tal-pressjoni jista' jkun relatat mal-volumi ta' gass permezz ta' kurva standard u minn dan jista' jiġi kkalkolat il-volum ta' gass prodott għal kull gramma ta' ħama xotta għal 48 siegħa. Dan l-indiċi ta' attività jintuża bħala wieħed mill-kriterji li permezz tiegħu tista' tiġi vvalutata l-validità tar-riżultati tat-test. Il-kurva ta' kalibrazzjoni tiġi prodotta bl-injezzjoni ta' volumi magħrufa ta' gass f'35 °C ± 2 °C fi fliexken tas-serum li fihom volum ta' ilma ugwali għal dak tat-taħlita ta' reazzjoni, V_R;

— Ferra' V_R ml alikwoti ta' ilma, miżmuma f'35 °C ± 2 °C f'ħames fliexken tas-serum. Issiġilla l-ilmijiet u qiegħedhom siegħa f'banjumarija 35 °C ± 2 °C sabiex jekwilibraw;

— Ixgħel il-miter tal-pressjoni, ħallih jistabbilizza, u aġġusta għal żero;

— Daħħal il-labra tas-siringa fis-siġill ta' wieħed mill-fliexken, iftaħ il-valv sakemm il-miter tal-pressjoni jaqra' żero u agħlaq il-valv;

— Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;

— Injetta 1 ml arja f'35 °C ± 2 °C f'kull flixkun. Daħħal il-labra (fuq il-miter) mis-siġill ta' wieħed mill-fliexken u ħalli l-qari tal-pressjoni jistabbilizza. Irreġistra l-pressjoni, iftaħ il-valv sakemm il-pressjoni taqra' żero u mbagħad agħlaq il-valv;

— Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;

— Irrepeti l-proċedura totali permezz ta' 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, u 50 ml arja;

— Ipplottja kurva ta' konverżjoni tal-pressjoni (Pa) mal-volum ta' gass injettat (ml). Ir-rispons tal-istrument huwa lineari matul fil-medda 0 Pa sa 70 000 Pa, u 0 ml sa 50 ml ta' produzzjoni tal-gass.

▼M6

Appendiċi 3

Fatturi identifikati li jistgħu jwasslu għal riżultati foloz

(a) *Kwalità tat-tappijiet tal-fliexken*

Fis-suq huma disponibbli tipi differenti ta' septa għall-fliexken tas-serum; li ħafna minnhon, inkluża l-gomma tal-butil, tonqsilhom il-impermeabbiltà meta jittaqqbu b'labra fil-kundizzjonijiet ta' dan it-test. Xi drabi l-pressjoni tinżel bil-mod ħafna, ladarba s-septum jittaqqab bil-labra tas-siringa. Huwa rakkomandat l-użu ta' septa impermeabbli għall-gass biex jiġu evitati tnixxijiet (paragrafu 12(b)).

(b) *Umdità fil-labra tas-siringa*

Kultant takkumula umdità fil-labra tas-siringa u t-tubi, u hija indikata minn qari tal-pressjoni ftit negattiv. Biex tirrettifika dan, neħħi l-labra u ħawwad it-tubi, nixxef b'karta assorbenti u waħħal labra ġdid (paragrafi 12(c) u 35).

(c) *Kontaminazzjoni tal-ossiġenu*

Metodi anaerobiċi huma soġġetti għal żball minn kontaminazzjoni mill-ossiġenu, li tista' tikkawża produzzjoni ta' gass iktar baxxa. F'dan il-metodu, din il-possibbiltà għandha titnaqqas bl-użu ta' tekniċi strettament anaerobiċi, inkluż l-użu ta' kompartiment tal-ingwanti.

(d) *Sottostrati grossi fil-ħama*

Il-produzzjoni ta' gass anaerobiku u s-sensittività tal-ħama, huma influwenzati minn sottostrati li huma ttrasferiti mill-inokulu għall-fliexken tat-test. Il-ħama diġerita mid-diġesturi anaerobiċi domestiċi xorta waħda ħafna drabi jkun fiha materja rikonoxxibbli bħal xagħar u residwi tal-pjanti ta' ċelluloża, li għandhom tendenza li jagħmluha diffiċli biex jittieħdu kampjuni rappreżentattivi. Billi l-ħama tingħadda minn passatur, il-materja grossa li ma tinħallx tista' titneħħa, u dan iżid il-probabbiltà ta' kampjunar rappreżentattiv (paragrafu 16).

(e) *Sustanzi kimiċi tat-test volatili*

Is-sustanzi kimiċi tat-test volatili sejrin jiġu rilaxxati fl-ispazju fil-wicc tal-fliexken tat-test. Dan jista' jirriżulta fit-telf ta' xi parti mill-materjal tat-test mis-sistema matul l-ivventjar wara l-kejliet tal-pressjoni, u dan jipproduċi b'mod qarrieqi valuri ta' EC_{50} għolja. B'għażla xierqa ta' proporzjon ta' volum ta' spazju fil-wiċċ mal-volum likwidu u billi ma jsirx ivventjar wara li jittieħdu l-kejliet tal-pressjoni, l-iżball jista' jitnaqqas (10).

(f) *Nuqqas ta' linearità tal-produzzjoni tal-gass*

Jekk il-plott tal-medja kumulattiva ta' produzzjoni tal-gass mal-ħin ta' inkubazzjoni ma tkunx bejn wieħed u ieħor lineari matul il-perjodu ta' 48 siegħa, l-eżattezza tat-test tista' titnaqqas. Biex jingħeleb dan, huwa rakkomandabbli li tintuża ħama ta' diġestjoni minn sors differenti u/jew li tiżdied konċentrazzjoni ikbar tal-brodu tan-nutrijenti u s-sottostrat tat-test, estratt tal-ħmira u glukożju (paragrafu 29).

▼M6

Appendiċi 4

Applikazzjoni għall-kampjuni ambjentali ta' konċentrazzjoni tal-bijomassa baxxa — tajn anaerobiku, naqal, eċċ.

INTRODUZZJONI

A.1 B'mod ġenerali, l-attività mikrobjali speċifika (volum tal-gass prodott għal kull gramma solidi xotti) ta' tajn anaerobiku, naqal, ħamriji naturali, eċċ, hija ferm iktar baxxa minn dik ta' ħama anaerobika derivata mid-drenaġġ. Minħabba dan, meta jridu jitkejlu l-effetti inibitorji tas-sustanzi kimiċi fuq dawn il-kampjuni inqas attivi, xi wħud mill-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu mmodifikati. Għal dawn il-kampjuni inqas attivi, hemm żewġ pjanijiet ta' azzjoni ġenerali possibbli:

(a) Wettaq test preliminari mmodifikat (paragrafu 25) bil-kampjun ta' tajn, ħamrija mhux dilwita, eċċ f'35 °C ± 2 °C jew fit-temperatura fl-istess sit tal-kampjun ta' ġbir, għal simulazzjoni iktar peċiża (bħal fil-Parti 1 tal-ISO 13 641);

(b) Jew wettaq it-test b'ħama ta' diġestur dilwita (1 f'100) biex tistimula l-attività baxxa mistennija mill-kampjun tal-ambjent, iżda żomm it-temperatura f'35 °C ± 2 °C (bħal fil-Parti 2 tal-ISO 13 641).

A.2 Opzjoni (a) tista' tintlaħaq billi jiġi segwit il-metodu deskritt hawnhekk (ekwivalenti għall-Parti 1 tal-ISO 13 641), iżda huwa essenzjali li jsir test preliminari (paragrafu 25) biex jiġu aċċertati l-aqwa kundizzonijiet, sakemm dawn ma jkunux diġà magħrufin minn ittestjar preċedenti. Il-kampjun ta' ħama jew naqal għandu jitħawwad sew, eż. fi blender, u, jekk ikun meħtieġ, dilwit bi proporzjon żgħir ta' ilma ta' dilwizzjoni li tneħħitlu l-arja (paragrafu 14) b'tali mod li jkun mobbli biżżejjed biex jiġi ttrasferit minn pipetta b'ponta ħoxna jew ċilindru tal-kejl. Jekk jitqies li n-nutrijenti jaf ikunu neqsin, il-kampjun tal-ħama jista' jiġi ċċentrifugat (f'kundizzjonijiet anaerobiċi) u sospiż mill-ġdid fil-midjum minerali li fih l-estratt tal-ħmira (A.11).

A.3 Opzjoni (b). Dan raġonevolment jimita l-attività baxxa ta' kampjuni ambjentali iżda jonqsu l-konċentrazzjoni għolja ta' solidi sospiżi li jinsabu f'dawn il-kampjuni. Ir-rwol ta' dawn is-solidi fl-inibizzjoni mhuwiex magħruf, iżda huwa possibbli li r-reazzjoni bejn is-sustanzi kimiċi tat-test u l-kostitwenti tat-tajn, kif ukoll l-adsorbiment tas-sustanzi kimiċi tat-test fis-solidi, jirriżultaw fi tnaqqis tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test.

A.4 It-temperatura hija fattur importanti ieħor: għal simulazzjoni stretta, għandhom isiru testijiet fit-temperatura tas-sit tal-kampjun, peress li gruppi differenti ta' konsorzji ta' batterji li jipproduċu l-metan huma magħrufa li joperaw f'meded ta' temperatura differenti, jiġifieri termofili (~ 30-35 °C), mesofili (20-25 °C) u psikrofili (< 20 °C), li jistgħu jese-bixxu mudelli inibitorji differenti.

A.5 Durata. Fit-test ġenerali, Parti 1, permezz ta' ħama mhux dilwita, il-produzzjoni ta' gass fil-jiem 2-4 dejjem kienet biżżejjed, filwaqt li fil-Parti 2 b'ħama dilwita f'mitt parti, ma ġiex prodott biżżejjed gass jew ma ġie prodott ebda gass, f'dan il-perjodu fir-ring test. Madsen et al (1996), fid-deskrizzjoni ta' dan l-aħħar test, jgħidu li tal-inqas għandhom jitħallew 7 ijiem.

Ittestjar b'konċentrazzjoni ta' bijomassa baxxa (Opzjoni b)

Għandhom isiru l-bidliet u l-emendi li ġejjin, li jżidu jew inaqqsu xi paragrafi u sottoparagrafi eżistenti tat-test ewlieni.

▼**M6**

A.6 Żid ma' Paragrafu 6: Prinċipju tat-test;

"Din it-teknika tista' tintuża b'ħama anaerobika dilwita f'mitt parti, parzjalment biex tistimula l-attività baxxa tat-tajn u n-naqal. It-temperatura ta' inkubazzjoni tista' tkun 35 °C jew dik tas-sit minn fejn inġabar il-kampjun. Peress li l-attività batterjali hija ferm iktar baxxa fil-ħama mhux dilwita, il-perjodu ta' inkubazzjoni għandu jiġi estiż għal tal-inqas 7 ijiem."

A.7 Żid ma' paragrafu 12 (a):

"l-inkubatur għandu jkun kapaċi jopera f'temperaturi ta' 15 °C."

A.8 Żid reaġent żejjed wara l-Paragrafu 13:

"Aċidu fosforiku (H_3PO_4), 85 % b'massa fl-ilma."

A.9 Żid fi tmiem il-Paragrafu 16:

"Uża konċentrazzjoni finali ta' 0,20 ± 0,05 g/l mit-total ta' solidi xotti fit-test."

A.10 Paragrafu 17. Sottostrat tat-test

Dan is-sottostrat ma għandux jintuża, iżda huwa sostitwit minn estratt tal-ħmira (ara l-paragrafi 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 Huwa meħtieġ midjum minerali, inklużi elementi ta' frak, għad-dilwizzjoni ta' ħama anaerobika, u għal konvenjenza, is-sottostrat organiku, l-estratt tal-ħmira, jiżdied ma' dan il-midjum.

Żid wara Paragrafu 17

"(a) Midjum minerali tat-test, b'estratt tal-ħmira.

Dan huwa ppreparat minn midjum tat-test ikkonċentrat għal 10 darbiet (paragrafu 17(b); A.12) b'soluzzjoni ta' element tal-frak (paragrafu 17(c); A.13). Uża nonaidrat tas-sulfur tas-sodju li jkun għadu kif ġie fornit (il-paragrafu 17(b); A.12) jew aħslu u nixxfu qabel l-użu, biex tiżgura li għandu kapaċità ta' tnaqqis suffiċjenti. Jekk it-test jitwettaq mingħajr l-użu ta' kompartiment tal-ingwanti (paragrafu 12(j)), il-konċentrazzjoni ta' sulfur tas-sodju fis-soluzzjoni ewlenija għandha tiżdied għal 2 g/l (minn 1 g/l). Sodium sulphide jista' jiżdied ukoll minn soluzzjoni ewlenija xierqa mis-septum tal-fliexken tat-test magħluqa, peress li din il-proċedura sejra tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni, biex tikseb konċentrazzjoni finali ta' 0,2 g/l. Inkella jista' jintuża ċ-ċitrat tat-titanju (III) (paragrafu 17(b)). Żidu mis-septum tal-fliexken tat-test magħluqa biex tikseb konċentrazzjoni ta' 0,8 mmol/l sa 1,0 mmol/l. Iċ-ċitrat tat-titanju (III) huwa aġent riduċenti effikaċi ħafna u b'tossiċità baxxa, li jiġi ppreparat kif ġej: Ħoll 2,94 g diidrat taċ-ċitrat tat-trisodju f'50 ml ilma tad-dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14) (li jirriżulta f'soluzzjoni ta' 200 mmol/l) u żid 5 ml ta' soluzzjoni klorur tat-titanju (III) (ilma ta' dilwizzjoni ta' 15 g/100 ml) Innewtralizza għal pH 7 ± 0,5 b'karbonat tas-sodju u ferra' ġo flixkun tas-serum xieraq taħt fluss ta' gass tan-nitroġenu. Il-konċentrazzjoni taċ-ċitrat tat-titanju (III) f'din is-soluzzjoni ewlenija hija ta' 164 mmol/l. Uża l-midjum tat-test mill-ewwel jew aħżen f'4 °C għal mhux iktar minn jum.

A.12 (b) Midjum tat-test ikkonċentrat għal għaxar darbiet, ippreparat b'dan li ġej:

anhydrous potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	2,7 g
Fosfat tal-idroġenu tad-disodju (Na_2HPO_4)	4,4 g
(jew 11,2 g dodekaidrat)	5,3 g
ammonium chloride (NH_4Cl)	

▼**M6**

klorur tal-kalċju diidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
essaidrat tal-klorur tal-manjeżju ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
tetraidrat (II) tal-klorur tal-ħadid ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resażurina (indikatur tar-redox)	0,01 g
nonaidrat tas-sulfur tas-sodju ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(jew (III) ċitrat tat-titanju) konċentrazzjoni finali	0,8 mmol/l sa 1,0 mmol/l
soluzzjoni ta' mikroelement (ara l-paragrafu 17 (c); A.13)	10,0 ml
estratt tal-ħmira	100 g
Ħoll f'ilma tad-dilwizzjoni (paragrafu 14) u imla sa:	1 000 ml

A.13 (c) Soluzzjoni ta' mikroelement, ippreparata b'dawn li ġejjin:

tetraidrat (II) tal-klorur tal-ħadid ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
aċidu orto-boriku (H_3BO_3)	0,05 g
klorur taż-żingu ($ZnCl_2$)	0,05 g
(II) klorur tar-ram ($CuCl_2$)	0,03 g
diidrat tal-molibdat tas-sodju ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
(II) essaidrat tal-klorur tal-kobalt ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
(II) essaidrat tal-klorur tal-nikil ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
disodium selenite (Na_2SeO_3)	0,05 g
Ħoll f'ilma tad-dilwizzjoni (paragrafu 14) u imla sa:	1 000 ml”

A.14 Paragrafu 25: Test preliminari

Huwa essenzjali li jsir test preliminari kif deskritt fil-paragrafu 24, ħlief li l-konċentrazzjoni ta' solidi tal-ħama għandha tkun mitt darba iżgħar minn ta' dawk mogħtija, li huma 0,1 g/l, 0,2 g/l u 0,4 g/l. Id-durata tal-inkubazzjoni għandha tkun tal-inqas ta' 7 ijiem.

Nota: Fir-ring test (5) il-volum ta' spazju fil-wiċċ kien ferm ogħla f'volum totali ta' 75 %; dan għandu jkun fil-medda rakkomandata ta' 10 %-40 %. Il-kriterju rilevanti huwa dak li l-volum ta' gass prodott f'inibizzjoni ta' madwar 80 % għandu jkun jista' jitkejjel bi preċiżjoni aċċettabbli (eż. ± 5 % sa ± 10 %).

A.15 Paragrafu 26 sa 30: Żieda ta' sustanza kimika tat-test, inokulu u sottostrat.

Iż-żidiet isiru bl-istess mod kif deskritt f'dawn il-paragrafi, iżda s-soluzzjoni tas-sottostrat (paragrafu 17) tiġi ssostitwita bil-midjum tat-test flimkien ma' sottostrat ta' estratt tal-ħmira (A.11).

Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni finali ta' solidi ta' ħama xotta titnaqqas minn 2 g/l — 4 g/l sa 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Żewġ eżempji ta' żieda ta' komponenti mat-taħlita tat-test jingħataw fit-Tabellla A.1, li tieħu post it-tabella fil-paragrafu 29.

A.16 Paragrafu 33: Inkubazzjoni tal-fliexken

Minħabba r-rata iktar baxxa mistennija ta' produzzjoni tal-gass, l-inkubazzjoni ssir għal tal-inqas 7 ijiem.

▼M6

A.17 Paragrafu 34: Kejliet tal-pressjoni

L-istess proċedura għall-kejl tal-pressjoni fl-ispazju fil-wiċċ tal-fliexken tintuża kif deskritt fil-paragrafu 34, jekk ikunu meħtieġa l-ammonti fil-fażi gassuża. Jekk għandhom jitkejlu l-ammonti totali ta' CO_2 flimkien ma' CH_4, il-pH tal-fażi likwida jitnaqqas għal madwar pH 2 bl-injezzjoni ta' H_3PO_4 f'kull flixkun rilevanti u l-kejl tal-pressjoni wara li jitħawwad għal madwar 30 minuta fit-temperatura tat-test. Madankollu, tista' tinkiseb iktar informazzjoni dwar il-kwalità tal-inokulu billi titkejjel il-pressjoni f'kull flixkun qabel u wara l-aċidifikazzjoni. Pereżempju, meta r-rata ta' produzzjoni ta' CO_2 tkun ferm ogħla minn dik tal-metan, is-sensittività tal-batterji fermentattivi tista' tinbidel u/jew il-batterji metanoġeniċi huma preferenzjalment affettwati mis-sustanza kimika tat-test.

A.18 Paragrafu 36: kejl tal-pH

Jekk sejjer jintuża H_3PO_4, għandhom jiġu kkonfigurati xi fliexken żejda, li magħhom ma għandu jiżdied ebda H_3PO_4, speċjalment għall-kejl tal-pH.

REFERENZA:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tabella A.1.

Eżempji tal-konfigurazzjoni tat-test għal-lottijiet tat-test

Kostitwenti tat-Taħlita ta' Reazzjoni	Eżempju 1	Eżempju 2	Ordni normali taż-żieda
Konċentrazzjoni tal-inokulu ppreparat (g/l)	0,42	2,1	—
Volum tal-inokulu miżjud (ml)	45	9	4
Konċentrazzjoni tal-inokulu fil-fliexken tat-test (g/l)	0,20	0,20	—
Volum tal-midjum tat-test miżjud (ml)	9	9	2
Volum tal-ilma ta' dilwizzjoni miżjud (ml)	36	72	3
Konċentrazzjoni tal-estratt tal-ħmira fil-fliexken tat-test (g/l)	9,7	9,7	—
Volum tas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (ml)	3	3	1
Volum totali tal-likwidu (ml)	93	93	—

▼**M6**

Appendiċi 5

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M6

C.35. TEST TAT-TOSSIĊITÀ *LUMBRICULUS* TAN-NAQAL/ILMA PERMEZZ TA' NAQAL MIŻJUD

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ittestjar (TG) 225 tal-OECD (2007). Annimali endobentiċi li jieklu n-naqal huma soġġetti għal espożizzjoni potenzjalment għolja għal sustanzi kimiċi mwaħħla man-naqal u għalhekk għandhom jingħataw attenzjoni preferenzjali, eż. (1), (2), (3). Fost dawn l-inġesturi tan-naqal, l-oligoċaeti akkwatiċi għandhom rwol importanti fin-naqal tas-sistemi akkwatiċi. Permezz ta' bijoturbazzjoni tan-naqal u billi jservu bħala priża, dawn l-annimali jista' jkollhom influwenza qawwija fuq il-bijodisponibbiltà ta' dawn is-sustanzi kimiċi għal organiżmi oħra, eż. ħut bentivoruż. Għall-kuntrarju ta' organiżmi epibentiċi, l-oligoċaeti akkwatiċi andobentiċi (eż. *Lumbriculus variegatus*) iħaffru fin-naqal, u jieklu frak tan-naqal taħt wiċċ in-naqal. Dan jiżgura espożizzjoni tal-organiżmi tat-test għas-sustanza kimika tat-test permezz tar-rotot ta' teħid possibbli kollha (eż. kuntatt ma', u inġestjoni ta' frak tan-naqal kontaminat, iżda anki permezz tal-ilma interstizjali u l-ilma tal-madwar).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jitfassal biex jivvaluta l-effetti ta' espożizzjoni mtawla tal-oligoċaeti endobentiċi *Lumbriculus variegatus* (Müller) għal sustanzi kimiċi assoċjati man-naqal. Huwa bbażat fuq il-protokolli tat-test tal-bijoakkumulazzjoni u t-tossiċità tan-naqal eżistenti, eż. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Il-metodu huwa deskritt għal kundizzjonijiet tat-test statiċi. Ix-xenarju ta' espożizzjoni użat f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa ż-żieda tan-naqal mas-sustanza kimika tat-test. L-użu ta' naqal miżjud huwa maħsub li jistimula naqal ikkontaminat b'sustanza kimika tat-test.

3. Is-sustanzi kimiċi li jeħtieġ li jiġu ttestjati għal organiżmi li jgħixu fin-naqal ġeneralment jippersistu f'dan il-kompartiment fuq perjodi ta' żmien twal. L-organiżmi li jgħixu f'dan in-naqal jistgħu jiġu esposti permezz ta' diversi rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni, u l-ħin li jittieħed għal kull waħda minnhom biex tikkontribwixxi għall-effetti tossiċi globali, tiddependi fuq il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika kkonċernata u d-destin finali tagħha fl-annimal. Għal sustanzi kimiċi adsorbenti ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5) jew għal sustanzi kimiċi li jeħlu b'mod kovalenti man-naqal, l-inġestjoni ta' ikel ikkontaminat jista' jkun rotta ta' espożizzjoni sinifikanti. Sabiex ma tiġix sottovalutata t-tossiċità ta' tali sustanzi kimiċi, l-ikel meħtieġ għar-riproduzzjoni u t-tkabbir tal-organiżmi tal-ittestjar jiżdied man-naqal qabel l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (11). Il-metodu ta' ttestjar deskritt huwa ddettaljat biżżejjed biex ikun jista' jitwettaq it-test, filwaqt li jippermetti adattamenti fid-disinn sperimentali skont il-kundizzjonijiet f'laboratorji partikolari u d-diversi karatteristiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test.

4. Il-metodu ta' ttestjar għandu l-għan li jistabbilixxi l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq ir-riproduzzjoni u l-bijomassa tal-organiżmi tat-test. Il-parametri bijoloġiċi mkejla huma n-numru totali ta' dud li baqa' ħaj u l-bijomassa (piż xott) fi tmiem l-espożizzjoni. Din id-dejta tiġi analizzata permezz ta' mudell ta' rigressjoni sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża effett ta' x % (eż. EC_{50}, EC_{25}, u EC_{10}), jew permezz ta' ipoteżi statistika bix tiġi ddeterminata l-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) u l-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC).

5. Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, "Test tat-tossiċità kironomid tan-naqal/ilma permezz ta' naqal miżjud" (6), ipprovda ħafna dettalji essenzjali u utli għat-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tat-tossiċità tan-naqal ippreżentat. Għalhekk, dan id-dokument iservi bħala bażi li permezz tiegħu twettqu l-modifiki meħtieġa għat-twettiq tat-testijiet tat-tossiċita tan-naqal b'*Lumbriculus variegatus*. Dokumenti oħra li ssir referenza għalihom huma eż. il-Gwida Standard tal-ASTM għad-Determinazzjoni tal-Bijoakkumulazzjoni tal-Kontaminanti Assoċjati man-Naqal minn Invertebrati Bentiċi (3), il-Metodi tal-EPA

▼M6

tal-Istati Uniti għall-Kejl tat-Tossiċità u l-Bijoakkumulazzjoni ta' Kontaminanti Assoċjati man-Naqal b'Invertebrati tal-Ilma Ħelu (7), u l-Gwida Standard tal-ASTM għall-Ġbir, il-Ħażna, il-Karatterizzazzjoni, u l-Manipulazzjoni tan-Naqal għall-Ittestjar Tossikoloġiku u għall-għażla ta' kampjuni użati biex jinġabru l-invertebrati bentiċi (12). Barra minn hekk, l-esperjenza prattika miksuba matul ir-ring testing tal-metodu ta' ttestjar ((13), ir-rapport dwar ir-ring test), u d-dettalji mid-dokumentazzjoni huma sorsi ewlenin ta' informazzjoni għat-tfassil ta' dan id-dokument.

PREREKWIŻIT U INFORMAZZJONI TA' GWIDA

6. Għandha tinkiseb informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test bħal prekawzjonijiet dwar is-sigurtà, kundizzjonijiet ta' ħżin xierqa u metodi analitiċi qabel ma jinbeda l-istudju. F'(14) hija pprovduta gwida għas-sustanzi kimiċi tat-test bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluhom diffiċili biex jitwettaq it-test.

7. Qabel ma jitwettaq test, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza kimika tat-test:

— isem komuni, isem tas-sustanza kimika (preferibbilment isem IUPAC), formola strutturali, numru tar-reġistru CAS, purità;

— il-pressjoni tal-fwar;

— solubbiltà fl-ilma.

8. L-informazzjoni addizzjonali li ġejja hija kkunsidrata utli qabel ma jinbeda t-test:

— koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma, K_{ow};

— koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju/ilma organiku, espress bħala K_{oc};

— idroliżi;

— fototrasformazzjoni fl-ilma;

— bijodegradabbiltà;

— tensjoni tal-wiċċ.

9. Għandha tinkiseb informazzjoni dwar ċerti karatteristiċi tan-naqal li sejjer jintuża qabel ma jinbeda t-test (7). Għal dettalji ara l-paragrafi 22 sa 25.

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Dud bi stat fiżjoloġiku simili (sinkronizzat kif deskritt fl-Appendiċi 5) huwa espost għal serje ta' konċentrazzjonijiet tossikanti applikati għall-faži tan-naqal ta' sistema tan-naqal/ilma. Bħala midjums għandhom jintużaw naqal artifiċjali u ilma rikostitwit. Ir-reċipjenti tat-test mingħajr iż-żieda tas-sustanzi kimiċi tat-test jservu bħala kontrolli. Is-sustanza kimika tat-test tiżdied man-naqal b'mod aggregat għal kull livell ta' konċentrazzjoni sabiex titnaqqas il-varjabbiltà bejn ir-repliki ta' kull livell ta' konċentrazzjoni, u l-organiżmi tat-test imbagħad jiġu introdotti fir-reċipjenti tat-test fejn ġew ekwilibrati n-naqal u l-konċentrazzjonijiet tal-ilma (ara l-paragrafu 29). L-annimali tat-test jiġu esposti għas-sistemi tan-naqal/ilma għal perjodu ta' 28 jum. Fid-dawl tal-kontenut baxx ta' nutrijenti tan-naqal artifiċjali, in-naqal għandu jiġi emendat b'sors ta' ikel (ara l-paragrafi 22 sa 23, u l-Appendiċi 4) biex jiġi żgurat li d-dud jikber u jirriproduċi ruħu f'kundizzjonijiet ta' kontroll. B'dan il-mod huwa żgurat li l-annimali tat-test jiġu esposti tul l-ilma u n-naqal kollu kif ukoll mill-ikel tagħhom.

11. Il-punt ta' tmiem ippreferut ta' dan it-tip ta' studju huwa EC_x (eż. EC_{50}, EC_{25}, u EC_{10}; il-konċentrazzjoni tal-effett, li taffettwa x % tal-organiżmi tat-test) għar-riproduzzjoni u l-bijomassa, rispettivament, meta mqabbel mal-kontroll. Madankollu, ta' min jinnota li fid-dawl tal-inċertezza qawwija ta' EC_x baxxa (eż. EC_{10}, EC_{25}) b'limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għoljin ħafna

▼M6

(eż. (15)) u s-setgħa statistika kkalkolata matul l-ittestjar tal-ipoteżi, l-EC_{50} titqies il-punt ta' tmiem l-iktar b'saħħtu. Barra minn hekk, tista' tiġi kkalkolata l-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC), u l-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) għall-bijomassa, u r-riproduzzjoni, jekk id-disinn tat-test u d-dejta jappoġġjaw dawn il-kalkoli (ara l-paragrafi 34 sa 38). Il-fini tal-istudju, l-EC_x jew id-derivazzjoni tal-NOEC, sejrin jiddeterminaw id-disinn tat-test.

ITTESTJAR TA' REFERENZA

12. Il-prestazzjoni tal-organiżmi ta' kontroll hija mistennija li turi b'mod suffiċjenti l-kapaċità ta' laboratorju li jwettaq it-test, u jekk tkun disponibbli dejta storika, ir-repetibbiltà tat-test. Barra minn hekk, jistgħu jitwettqu testijiet ta' referenza tat-tossiċità f'intervalli regolari permezz ta' tossikanti ta' referenza biex tiġi vvalutata s-sensittività tal-organiżmi tat-test. Testijiet tat-tossiċità ta' referenza ta' 96 siegħa fl-ilma biss jistgħu juru b'mod sodisfaċenti, is-sensittività u l-kundizzjoni tal-annimali tat-test (4)(7). Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-pentaklorofenol (PCP) f'testijiet kompluti (espożizzjoni ta' 28 jum għal naqal miżjud) hija inkluża fl-Appendiċi 6, u fir-rapport dwar ir-ring test tal-Metodu ta' Ttestjar (13). It-tossiċità akuta, fl-ilma biss tal-PCP hija deskritta eż. f'(16). Din l-informazzjoni tista' tintuża għal paragun tas-sensittività tal-organiżmu tat-test f'testijiet ta' referenza b'PCP bħala t-tossikant ta' referenza. Il-klorur tal-potassju (KCl) jew is-sulfat tar-ram ($CuSO_4$) ġew rakkomandati bħala t-tossikanti ta' referenza b'*L. variegatus* (4)(7). S'issa, l-istabbiliment ta' kriterji tal-kwalità abbażi tat-tossiċità tad-dejta għall-KCl huwa diffiċli minħabba n-nuqqas ta' dejta mid-dokumentazzjoni għal *L. variegatus*. Informazzjoni dwar it-tossiċità tar-ram għal *L. variegatus* tista' tinstab f'(17) sa (21).

VALIDITÀ TAT-TEST

13. Għal test biex ikun validu, għandhom jiġu ssodisfati r-rekwiżiti li ġejjin:

— Ring test (13) wera li għal Lumbriculus variegatus, in-numru medju ta' dud li baqa' ħaj għal kull replikat fil-kontrolli kellu jiżdied b'fattur ta' mill-inqas 1,8 fi tmiem l-espożizzjoni meta mqabbel man-numru ta' dud għal kull replikat fil-bidu tal-espożizzjoni.

— Il-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun bejn 6 u 9 matul it-test kollu.

— Il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu fl-ilma tal-madwar ma għandhiex tkun ta' inqas minn 30 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV) fit-temperatura tat-test matul it-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Sistema tat-test

14. Huma rakkomandati sistemi statiċi mingħajr tiġdid tal-ilma tal-madwar. Jekk il-proporzjon ta' naqal/ilma (ara l-paragrafu 15) huwa xieraq, arjazzjoni bil-mod sejra tkun normalment biżżejjed biex iżżomm il-kwalità tal-ilma f'livelli aċċettabbli għall-organiżmi tat-test (eż. jiġu massimizzati l-livelli ta' ossiġenu maħlula, tiġi minimizzata l-akkumulazzjoni ta' prodotti eskritorjali). Sistemi semistatiċi jew bi fluss kontinwu b'tiġdid intermittenti jew kontinwu tal-ilma tal-madwar għandhom jintużaw biss f'każijiet eċċezzjonali, peress li t-tiġdid regolari tal-ilma tal-madwar huwa mistenni li jaffettwa l-ekwilibriju tas-sustanza kimika (eż. telfiet tas-sustanza kimika tat-test mis-sistema tat-test).

Reċipjenti u apparat tat-test

15. L-espożizzjoni għandha ssir f'bekkijiet tal-ħġieġ ta' eż. 250 ml li għandhom dijametru ta' 6 cm. Jistgħu jintużaw ukoll reċipjenti tal-ħġieġ xierqa oħra, iżda dawn għandhom jiggarantixxu fond xieraq tal-ilma tal-madwar u n-naqal. Kull reċipjent għandu jirċievi saff ta' madwar 1,5 — 3 cm ta' naqal formulat. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal mas-saff tal-ilma

▼M6

tal-madwar għandu jkun ta' 1:4. Ir-reċipjenti għandhom ikunu ta' kapaċità xierqa f'konformità mar-rata ta' tagħbija, jiġifieri n-numru ta' dud tat-test miżjud ma' kull unità ta' ppeżar tan-naqal, (ara wkoll il-paragrafu 39).

16. Ir-reċipjenti tat-test u apparat ieħor li sejrin jiġu f'kuntatt mas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom ikunu magħmula kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat l-użu ta' materjali, għall-partijiet kollha tat-tagħmir li jistgħu jħollu, jadsorbu s-sustanzi kimiċi tat-test jew jiffiltraw sustanzi kimiċi oħrajn u jkollhom effett avvers fuq l-annimali tat-test. Għandu jintuża politetrafluworoetilen (PTFE), azzar inossidabbli u/jew ħġieġ għal kwalunkwe tagħmir li jkollu kuntatt mal-midjums tat-test. Għal sustanzi kimiċi organiċi magħrufa li jadsorbu mal-ħġieġ, jaf ikun meħtieġ ħġieġ silanizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet, it-tagħmir sejjer ikollu jintrema wara l-użu.

Speċijiet tat-test

17. L-ispeċi tal-ittestjar użata f'dan it-tip ta' studju hija l-oligoċaeta tal-ilma ħelu *Lumbriculus variegatus* (Müller). Din l-ispeċi tiflaħ għal firxa wiesgħa ta' tipi ta' naqal, u tintuża ħafna għat-tossiċità tan-naqal u l-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni [eż. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Għandu jiġi rrapportat l-oriġini tal-annimali tat-test, il-konferma tal-identità tal-ispeċijiet (eż. (36)) kif ukoll il-kundizzjonijiet tal-kultura. L-identifikazzjoni tal-ispeċi mhijiex meħtieġa qabel kull test, jekk l-organiżmi jkunu ġejjin minn kultura domestika.

Kulturi tal-organiżmi tat-test

18. Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' dud għat-twettiq tat-testijiet tat-tossiċità tan-naqal, huwa utli li d-dud jinżamm f'kultura tal-laboratorju permanenti. Il-gwida għall-metodi tal-kulturi tal-laboratorju għal *Lumbriculus variegatus*, u s-sorsi ta' kulturi li jibdew il-fermentazzjoni jingħataw fl-Appendiċi 5. Għal dettalji dwar il-kulturi ta' din l-ispeċi, ara r-referenzi (3), (7), (27).

19. Biex jiġi żgurat li t-testijiet jitwettqu b'annimali tal-istess speċi, huwa rakkomandat ħafna l-istabbiliment ta' kulturi tal-ispeċi uniċi. Assigura li l-kulturi u speċjalment id-dud użat fit-testijiet ma għandhom ebda mard u anormalitajiet osservabbli.

Ilma

20. Huwa rakkomandat ilma rikostitwit skont il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness (37) għall-użu bħala ilma tal-madwar fit-testijiet; jista' jintuża wkoll għall-kulturi fil-laboratorju tad-dud (ara l-Appendiċi 2 għall-preparazzjonijiet). Jekk ikun meħtieġ, jista' jintuża ilma naturali. L-ilma magħżul għandu jkun ta' kwalità li sejjer jippermetti t-tkabbir u r-riproduzzjoni tal-ispeċi tat-test għal matul il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni u ttestjar mingħajr ebda dehra jew imġiba anormali. *Lumbriculus variegatus* intwera li jibqa' ħaj, jikber, u jirriproduċi f'dan it-tip ta' ilma (30), u hija pprovduta standardizzazzjoni massima tal-kundizzjonijiet tat-test u l-kulturi. Jekk jintuża ilma rikostitwit, il-kompożizzjoni tiegħu għandha tiġi rrapportata, u l-ilma għandu jiġi kkaratterizzat qabel l-użu tal-inqas mill-pH, il-kontenut ta' ossiġenu, u l-ebusija (espressi bħala mg $CaCO_3$/l). Analiżi tal-ilma għall-mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu jaf tipprovdi informazzjoni utli (ara eż. Appendiċi 3).

21. Il-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun fil-medda bejn 6,0 sa 9,0 (ara l-paragrafu 13). Jekk tkun mistennija żieda fl-iżvilupp tal-ammonja, huwa kkunsidrat utli li l-pH jinżamm bejn 6,0 u 8,0. Għall-ittestjar ta' eż. aċidi organiċi dgħajfa, huwa rakkomandabbli li l-pH jiġi aġġustat bl-ilqugħ tal-ilma li għandu jintuża fit-test, kif deskritt eż. f'(16). L-ebusija totali tal-ilma li għandu jintuża fit-test għandha tkun bejn 90 u 300 mg $CaCO_3$ għal kull litru għall-ilma naturali. L-Appendiċi 3 jiġbor fil-qosor il-kriterji addizzjonali għal ilma tad-dilwizzjoni aċċettabbli skont il-Linja Gwida tal-OECD Nru. 210 (38).

▼M6

Naqal

22. Peress li naqal naturali mhux ikkontaminat minn daqs tal-frak jaf ma jkunx disponibbli matul is-sena kollha, u organiżmi indiġeni kif ukoll il-preżenza ta' mikrosustanzi li jniġġsu jistgħu jinfluwenzaw it-test, għandu preferibbilment jintuża naqal ifformulat (imsejjaħ ukoll sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). L-użu ta' naqal formulat inaqqas il-varjabbiltà tal-kundizzjonijiet tat-test kif ukoll l-introduzzjoni ta' fawna indiġena. In-naqal formulat li ġej huwa bbażat fuq in-naqal artifiċjali skont (6), (39) u (40). Huwa rakkomandat għall-użu f'dan it-tip ta' test ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

(a) 4-5 % (piż xott) ta' pit ta' sfanju; huwa importanti li l-pit jintuża f'forma ta' trab, bi grad ta' dekompożizzjoni: "midjum", mitħun irqiq (daqs tal-frak ≤ 0,5 mm), u mnixxef biss bl-arja.

(b) 20 ± 1 % (piż xott) tafal tal-kawlina (kontenut ta' kawlinite preferibbilment ta' iktar minn 30 %).

(c) 75-76 % (piż xott) ramel kwarzuż (ramel irqiq, daqs tal-frak: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-frak għandu jkun fil-medda ta' 50-200 μm).

(d) Ilma dejonizzat, 30–50 % tal-piż xott tan-naqal, flimkien mal-komponenti ta' naqal xott.

(e) Jiżdied karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura ($CaCO_3$) sabiex jiġi aġġustat il-pH tat-taħlita finali tan-naqal.

(f) Il-kontenut ta' karbonju organiku totali (TOC) tat-taħlita finali għandu jkun 2 % (± 0,5 %) tal-piż xott tan-naqal u għandu jiġi aġġustat permezz ta' ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

(g) L-ikel, eż. weraq f'forma ta' trab ta' Ħurrieq (Urtica sp., skont l-istandards farmaċewtiċi, għall-konsum mill-bniedem), jew taħlita ta' weraq f'forma ta' trab ta' Urtica sp. b'alfaċelluloża (1:1), f'0,4 — 0,5 % tal-piż xott tan-naqal, flimkien mal-komponenti tan-naqal xott; għal dettalji ara l-Appendiċi 4.

23. Is-sors tal-pit, it-tafal tal-kawlina, il-materjal tal-ikel, u r-ramel għandhom ikunu magħrufa. Minbarra l-punt g), Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness (6) jelenka materjali tal-pjanti alternattivi li għandhom jintużaw bħala sors ta' nutrijenti: weraq deidratati taċ-ċawsli (*Morus alba*), silla bajda (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*), jew ħaxix taċ-ċereali.

24. Is-sors ta' ikel magħżul għandu jiżdied qabel jew matul iż-żieda tan-naqal bis-sustanza kimika tat-test. Is-sors ta' ikel magħżul għandu jippermetti għal tal-inqas riproduzzjoni aċċettabbli fil-kontrolli. Analiżi tan-naqal artifiċjali jew il-kostitwenti tiegħu għal mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu, tista' tipprovdi informazzjoni utli. Eżempju għall-preparazzjoni tan-naqal formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 4. It-taħlit ta' kostitwenti xotta huwa aċċettabbli wkoll jekk jintwera li wara ż-żieda tal-ilma tal-madwar, ma sseħħx separazzjoni tal-kostitwenti tan-naqal (eż. iż-żamma fil-wiċċ ta' frak tal-pit), u li l-pit jew in-naqal huwa suffiċjentement kundizzjonat (ara wkoll il-paragrafu 25 u l-Appendiċi 4). In-naqal artifiċjali għandu jkun ikkaratterizzat b'tal-inqas mill-oriġini tal-kostitwenti, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-frak (ir-ramel perċentwali, il-ħama, u t-tafal), il-kontenut totali tal-karbonju organiku (TOC), il-kontenut ta' ilma, u l-pH. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox huwa fakultattiv.

25. Jekk ikun meħtieġ, eż. għal finijiet ta' ttestjar speċifiku, in-naqal naturali minn siti mhux imniġġsa jaf iservi wkoll bħala naqal tat-test u/jew tal-kulturi (3). Madankollu, jekk jintuża naqal naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat b'tal-inqas mill-oriġini (sit ta' kollezzjoni), il-pH u l-ammonja tal-ilma interstizjali, il-kontenut ta' karbonju organiku totali (TOC) u l-kontenut ta' nitroġenu, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-frak (ramel perċentwali, ħama, u tafal)

▼M6

kontenut ta' ilma perċentwali (7), u ma għandu jkollu ebda kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu magħhom, jew jikkaċċjaw għall-organiżmi tat-test. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox u l-kapaċità tal-iskambju katjoniku huwa fakultattiv. Huwa rakkomandat ukoll li, qabel jiżdied bis-sustanza kimika tat-test, in-naqal naturali jkun soġġett għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jkunu jeżistu fit-test sussegwenti. Fi tmiem dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema.

26. In-naqal li għandu jintuża għandu jkun ta' kwalità li sejjer jippermetti s-sopravivenza u r-riproduzzjoni tal-organiżmi ta' kontroll għad-durata tal-perjodu ta' espożizzjoni mingħajr ma tintwera ebda dehra jew imġiba anormali. Iż-żewġ dud għandhom iħaffru fin-naqal, u għandhom jieklu n-naqal. Ir-riproduzzjoni fil-kontrolli għandha tal-inqas tkun skont il-kriterju ta' validità kif deskritt fil-paragrafu 13. Il-preżenza jew in-nuqqas ta' gerbub tal-ippurgar fuq wiċċ in-naqal, li tindika inġestjoni tan-naqal mid-dud, għandha tiġi rreġistrata u tista' tkun utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test fir-rigward tal-mogħdijiet ta' espożizzjoni. Informazzjoni addizzjonali dwar l-inġestjoni tan-naqal tista' tinkiseb permezz tal-metodi deskritti f'(24), (25), (44), u (45), li jispeċifikaw l-inġestjoni tan-naqal jew l-għażla tal-frak fl-organiżmi tat-test.

27. Il-proċeduri ta' manipulazzjoni għan-naqal naturali qabel l-użu fil-laboratorju huma deskritti f'(3), (7), u (12). Il-preparazzjoni u l-ħżin tan-naqal artifiċjali li huwa rakkomandat li jintuża fit-test ta' *Lumbriculus* huma deskritti fl-Appendiċi 4.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

28. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiżdied man-naqal. Peress li l-biċċa l-kbira tas-sustanzi kimiċi tat-test huma mistennija jkollhom solubbiltà baxxa fl-ilma, dawn għandhom jinħallu f'solvent organiku xieraq eż. aċetun, n-essan, ċikloessan) f'volum żgħir kemm jista' jkun sabiex tiġi ppreparata s-soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija għandha titħallat mal-istess solvent biex jiġu ppreparati s-soluzzjonijiet tat-test. It-tossiċità u l-volatilità tas-solvent, u s-solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent magħżul għandhom ikunu l-kriterji ewlenin għall-għalża ta' aġent solubilizzanti xieraq. Għal kull livell ta' konċentrazzjoni, għandu jintuża l-istess volum ta' soluzzjoni korrispondenti. In-naqal għandu jiżdied b'mod aggregat għal kull livell ta' konċentrazzjoni sabiex titnaqqas il-varjabbiltà bejn ir-repliki tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Kull waħda mis-soluzzjonijiet tat-test imbagħad titħallat ma' ramel kwarzuż kif deskritt fil-paragrafu 22 (eż. 10 g ta' ramel kwarzuż għal kull reċipjent tat-test). Sabiex ir-ramel kwarzuż jixxarrab kompletament, volum ta' 0,20 — 0,25 ml għal kull gramma ta' ramel instab li huwa suffiċjenti. Minn hemm 'il quddiem, is-solvent għandu jiġi evaporat sa ma jinxef. Sabiex jitnaqqsu t-telfiet tas-sustanza kimika tat-test permezz tal-koevaporazzjoni (eż. skont il-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika), ir-ramel miksi għandu jintuża minnufih wara li jitnixxef. Ir-ramel xott jitħallat ma' ammont xieraq ta' naqal formulat tal-livell ta' konċentrazzjoni korrispondenti. L-ammont ta' ramel ipprovdut mit-taħlita ta' ramel u sustanza kimika tat-test għandu jitqies meta jiġi ppreparat in-naqal (jiġifieri n-naqal għandu għalhekk jiġi ppreparat b'inqas ramel). Il-vantaġġ ewlieni ta' din il-proċedura huwa dak li virtwalment ma jiddaħħal ebda solvent fin-naqal (7). Inkella, eż. għal naqal tal-għelieqi, is-sustanza kimika tat-test tista' tiżdied b'porzjon xott u mitħun irqiq tan-naqal kif deskritt hawn fuq għar-ramel kwarzuż, jew billi s-sustanza kimika tat-test titħallat fin-naqal imxarrab, b'evaporazzjoni sussegwenti ta' kwalunkwe aġent solubilizzanti użat. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test miżjuda man-naqal tiġi distribwita sew u b'mod uniformi fin-naqal. Jekk ikun meħtieġ, jistgħu jiġu analizzati s-sottokampjuni biex jiġu kkonfermati l-konċentrazzjonijiet fil-mira fin-naqal, u biex jiġi

▼M6

ddeterminat il-grad ta' omoġenità. Jaf ikun utli li jiġu analizzati s-sottokampjuni tas-soluzzjonijiet tat-test biex jiġu kkonfermati l-konċentrazzjonijiet fil-mira fin-naqal. Peress li solvent jintuża għall-kisi tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-ramel kawrzuż, għandu jintuża kontroll tas-solvent li jiġi ppreparat bl-istess ammont ta' solvent bħan-naqal tat-test. Għandu jiġi rrapportat il-metodu użat għaż-żieda, u r-raġunijiet għall-għażla ta' proċedura ta' żieda speċifika minbarra dik deskritta hawn fuq. Il-metodu ta' żieda jista' jiġi adattat għall-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, eż. biex jiġi evitat telf minħabba volatilizzazzjoni matul iż-żieda jew l-ekwilibrazzjoni. Gwida addizzjonali dwar il-proċeduri ta' żieda tingħata f'Environment Canada (1995) (46).

29. Ladarba n-naqal miżjud ikun ġie ppreparat, distribwit fir-reċipjenti tat-test tar-repliki, u mimli bil-ilma tat-test, huwa rakkomandabbli li tkun tista' ssir il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test min-naqal għall-faži milwiema (eż. (3)(7)(9)). Dan preferibbilment għandu jsir fil-kundizzjonijiet ta' temperatura u arjazzjoni użati fit-test. Il-ħin ta' ekwilibrazzjoni xieraq huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanzi kimiċi, u jista' jkun f'ordni ta' sigħat sa jiem u f'każijiet rari sa diversi ġimgħat (4-5 ġimgħat) (eż. (27)(47)). F'dan it-test, ekwilibriju mhuwiex mistenni, iżda huwa rakkomandat perjodu ta' ekwilibrazzjoni ta' 48 siegħa sa 7 ijiem. Għalhekk, il-ħin għad-degradazzjoni tas-sustanza kimika tat-test sejjer kemm jista' jkun jitnaqqas. Skont il-fini tal-istudju, eż. meta jridu jiġu imitati kundizzjonijiet ambjentali, in-naqal miżjud jista' jiġi ekwilibrat jew jitqaddem għal perjodu itwal.

30. Fi tmiem dan il-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, għandhom jittieħdu kampjuni tal-inqas tal-ilma tal-madwar u n-naqal aggregat, tal-inqas fl-ogħla konċentrazzjonijiet u waħda iktar baxxa, għall-analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Dawn l-analiżjiet kwantitattivi tas-sustanza kimika tat-test għandhom jippermettu l-kalkolu tal-bilanċ tal-massa u espressjoni tar-riżultati abbaži tal-konċentrazzjonijiet imkejla fil-bidu. B'mod ġenerali, il-kampjun ifixkel jew jeqred is-sistema tal-ilma/naqal. Għalhekk, ġeneralment mhuwiex possibbli li jintużaw l-istess repliki għall-kampjunar tan-naqal u d-dud. Għandhom jiġu stabbiliti reċipjenti "analitiċi" ta' dimensjonijiet xierqa, li jiġu ttrattati bl-istess mod (inkluż il-preżenza tal-organiżmi tat-test) iżda li ma jintużawx għal osservazzjonijiet bijoloġiċi. Id-dimensjonijiet tar-reċipjent għandhom jintgħażlu biex jipprovdu l-ammont ta' kampjuni meħtieġa mill-metodu analitiku. Dettalji tal-kampjunar huma deskritti fil-paragrafu 53.

TWETTIQ TAT-TEST

Test preliminari

31. Jekk ma tkun disponibbli ebda informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għal *Lumbriculus variegatus,* jaf ikun utli li jitwettaq esperiment preliminari sabiex tiġi ddeterminata l-medda ta' konċentrazzjonijiet li għandhom jiġu ttestjati fit-test finali, u biex jittejbu l-kundizzjonijiet tat-test tat-test finali. Għal dan il-għan, tintuża serje ta' konċentrazzjonijiet distanzjati tas-sustanza kimika tat-test. Id-dud jiġi espost għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għal perjodu (eż. 28 jum bħal fit-test finali) li jippermetti stima tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa; mhuma meħtieġa ebda repliki. L-imġiba tad-dud, pereżempju l-evitar tan-naqal, li jista' jiġi kkawżat mis-sustanza kimika tat-test u/jew in-naqal, għandha tiġi osservata u rreġistrata matul test preliminari. Il-konċentrazzjonijiet ogħla minn 1 000 mg/kg ta' piż xott tan-naqal ma għandhomx jiġu ttestjati fit-test preliminari.

Test finali

32. Fit-test finali, għandhom jintużaw u jintgħażlu tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet, eż. abbaži tar-riżultat tat-test preliminari tas-sejba tal-medda (paragrafu 31) u kif deskritt fil-paragrafi 35, 36, 37 u 38.

▼M6

33. Isir kontroll (għar-replikazzjoni ara l-paragrafi 36, 37 u 38) li fih il-kostitwenti kollha, ħlief is-sustanza kimika tat-test, flimkien ma' serje ta' testijiet. Jekk jintuża xi aġent solubilizzanti għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, dan għandu jkollu effett sinifikanti fuq l-organiżmi tat-test kif żvelat minn kontroll addizzjonali b'solvent biss.

Disinn tat-test

34. Id-disinn tat-test huwa relatat mal-għażla tan-numru u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' reċipjenti f'kull konċentrazzjoni u n-numru ta' dud miżjud f'kull reċipjent. Id-disinji għall-istima tal-EC_x, għall-istima tal-NOEC, u għat-twettiq ta' test tal-limitazzjoni huma deskritti fil-paragrafi 35, 36, 37 u 38.

35. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza kimika għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom ikunu "bracketed" bil-konċentrazzjonijiet inklużi fit-test. Estrapolazzjoni ferm iktar baxxa mill-inqas konċentrazzjoni li taffettwa l-organiżmi tat-test jew iktar mill-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha tiġi evitata. Jekk — f'każijiet eċċezzjonali — issir estrapolazzjoni bħal din, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa fir-rapport.

36. Jekk għandha tiġi stmata l-EC_x, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet u minimu ta' tliet repliki għal kull konċentrazzjoni; sitt repliki huma rakkomandati għall-kontroll jew — jekk jintuża — il-kontroll tas-solvent sabiex tittejjeb l-istima tal-varjabbiltà tal-kontroll. Xorta waħda huwa rakkomandat li jintużaw konċentrazzjonijiet tat-test suffiċjenti biex ikun hemm stima tal-mudell tajba. Il-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun iktar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet meta l-kurva konċentrazzjoni rispons għandha gradjent baxx). In-numru ta' repliki f'kull trattament jista' jitnaqqas jekk jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi fil-medda ta' 5 – 95 %. Iż-żieda fin-numru ta' repliki jew it-tnaqqis fid-daqs tal-intervalli tal-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom it-tendenza li jwasslu għal intervalli ta' kunfidenza iqsar għat-test.

37. Jekk għandhom jiġu stmati l-valuri LOEC/NOEC, għandhom jintużaw tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test b'tal-inqas erba' repliki (huma rakkomandati sitt repliki għall-kontroll jew — jekk jintuża — il-kontroll tas-solvent sabiex tittejjeb l-istima tal-varjabbiltà ta' kontroll), u l-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn. F'Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipoteżi fir-ring test tal-metodu ta' ttestjar.

38. Jista' jitwettaq test tal-limitu (permezz ta' konċentrazzjoni tat-test waħda u l-kontrolli), jekk ma jkunu mistennija ebda effetti sa 1 000 mg/kg ta' piż xott tan-naqal (eż. minn test preliminari tas-sejba tal-medda), jew jekk l-ittestjar f'konċentrazzjoni waħda sejjer ikun adegwat biex jikkonferma valur ta' interess tal-NOEC. F'dan l-aħħar każ, għandu jiġi inkluż raġunament iddettaljat għall-għażla tal-konċentrazzjoni tal-limitu fir-rapport tat-test. Il-fini tat-test tal-limitu huwa li jitwettaq test f'konċentrazzjoni suffiċjentement għolja biex dawk li jieħdu d-deċiżjonijiet ikunu jistgħu jeskludu l-effetti tossiċi possibbli tas-sustanza kimika, u l-limitu huwa stabbilit f'konċentrazzjoni li mhijiex mistennija li tidher f'xi sitwazzjoni. Huwa rakkomandat 1 000 mg/kg (piż xott). Ġeneralment, tal-inqas huma meħtieġa sitt repliki kemm għat-trattament kif ukoll il-kontrolli. F'Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipoteżi fir-ring test tal-metodu ta' ttestjar.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni

Organiżmi tat-test

39. It-test jitwettaq b'tal-inqas 10 dud għal kull replikat użat għad-determinazzjoni tal-parametri bijoloġiċi. Dan in-numru ta' dud jikkorrispondi għal madwar 50 — 100 mg ta' bijomassa mxarrba. Jekk wieħed jassumi kontenut xott ta' 17,1 % (48), dan jirriżulta f'madwar 9 — 17 mg ta' bijomassa xotta

▼M6

għal kull reċipjent. U.S. EPA (2000 (7)) trakkomanda li tintuża rata ta' tagħbija li ma taqbiżx 1: 50 (bijomassa xotta: TOC). Għan-naqal formulat deskritt fil-paragrafu 22, dan jikkorrispondi għal madwar 43 g ta' naqal (piż xott) għal kull 10 dud f'kontenut ta' TOC ta' 2,0 % ta' naqal xott. F'każijiet fejn jintużaw iktar minn 10 dud għal kull reċipjent, l-ammont ta' naqal u ilma tal-madwar għandu jiġi aġġustat kif xieraq.

40. Id-dud użat f'test għandu joriġina kollu mill-istess sors, u għandu jkun annimal fi stat psikoloġiku simili (ara l-Appendiċi 5). Għandu jintgħażel dud ta' daqs simili (ara l-paragrafu 39). Huwa rakkomandat li sottokampjun tal-lott jew l-istokk tad-dud jintiżen qabel it-test sabiex jiġi stmat il-piż medju.

41. Id-dud li għandu jintuża fit-test jitneħħa mill-kultura (ara l-Appendiċi 5 għal dettalji). Annimali (adulti) kbar li ma juru ebda sinjali ta' frammentazzjoni riċenti jiġu ttrasferiti lejn dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma nadif. Dawn jiġu sinkronizzati sussegwentement kif deskritt fl-Appendiċi 5. Wara riġenerazzjoni għal perjodu ta' 10 sa 14-il jum, għat-test għandu jintuża dud komplet intatt b'daqs simili, li jkun attivament qiegħed jgħum jew jitkaxkar wara stimulu mekkaniku bil-mod. Jekk il-kundizzjonijiet tat-test huma differenti mill-kundizzjonijiet tal-kultura (eż. fit-temperatura, ir-reġim ta' dawl, u l-ilma tal-madwar), fażi ta' akklimazzjoni ta' eż. 24 siegħa f'temperatura, reġim tad-dawl, u permezz tal-istess ilma tal-madwar bħal fit-test għandha tkun suffiċjenti biex id-dud jiġi adattat għall-kundizzjonijiet tat-test. L-oligochaetes adattati għandhom jiġu allokati b'mod każwali għar-reċipjenti tat-test.

Tagħlif

42. Peress li l-ikel jiżdied man-naqal qabel (jew matul) l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, id-dud ma jerġax jingħalef matul it-test.

Dawl u temperatura

43. Il-fotoperjodu fil-kultura u t-test, ġeneralment huwa ta' 16-il siegħa (3), (7). L-intensità tad-dawl għandha tinżamm baxxa (eż. 100-500 lx) biex jiġu imitati kundizzjonijiet naturali f'wiċċ in-naqal, u titkejjel tal-inqas darba matul il-perjodu ta' espożizzjoni. It-temperatura għandha tkun ta' 20 °C ± 2 °C matul it-test kollu. F'data ta' kejl waħda partikolari, id-differenza tat-temperatura bejn ir-reċipjenti tat-test ma għandhiex tkun iktar minn ± 1 °C. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitqiegħdu fl-inkubatur tal-ittestjar jew l-erja tal-ittestjar b'mod randomizzat, eż. sabiex titnaqqas l-imparzjalità tar-riproduzzjoni minħabba l-post tar-reċipjent.

Arjazzjoni

44. L-ilma tal-madwar tar-reċipjenti tat-test għandu jiġi arjat bil-mod (eż. 2 — 4 bużżieqa fis-sekonda) permezz ta' pasteur pipette li titqiegħed madwar 2 cm 'il fuq minn wiċċ in-naqal biex b'hekk titnaqqas il-perturbazzjoni tan-naqal. Wieħed għandu joqgħod attent li l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu maħlul ma taqax taħt it-30 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV). Il-provvista tal-arja għandha tiġi kkontrollata u — jekk ikun meħtieġ — aġġustata tal-inqas darba kuljum fil-jiem tax-xogħol.

Kejliet tal-kwalità tal-ilma

45. Il-parametri tal-kwalità tal-ilma li ġejjin għandhom jitkejlu fl-ilma tal-madwar:

Temperatura:	tal-inqas reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wieħed tal-kontrolli darba fil-ġimgħa u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; jekk ikun possibbli, it-temperatura fil-midjum tal-madwar (l-arja tal-ambjent jew banjumarija) tista' tiġi rreġistrata eż. f'intervalli ta' siegħa;

▼**M6**

Kontenut ta' ossiġenu dissolt:	tal-inqas f'reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wieħed tal-kontrolli darba fil-ġimgħa u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; espress bħala mg/l u % ASV (valur ta' saturazzjoni tal-arja);
Provvista tal-arja:	għandha tiġi kkontrollata tal-inqas darba kuljum fil-jiem tax-xogħol u — jekk ikun meħtieġ — aġġustata;
pH:	tal-inqas f'reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wieħed tal-kontroll darba fil-ġimgħa u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni;
Ebusija totali tal-ilma:	tal-inqas replikat wieħed tal-kontrolli u reċipjent tat-test wieħed bl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; espressa bħala mg/l $CaCO_3$;
Kontenut totali ta' ammonijaka:	tal-inqas replikat wieħed tal-kontrolli u f'reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni, u sussegwentement 3 darbiet fil-ġimgħa; espress bħala mg/l NH_4^+ jew NH_3 jew ammonijaka-N totali.

Jekk il-kejl tal-parametri tal-ilma jeħtieġ it-tneħħija ta' kampjuni sinifikanti ta' ilma mir-reċipjenti, jaf ikun rakkomandabbli li jiġu stabbiliti reċipjenti separati għall-kejliet tal-kwalità tal-ilma sabiex ma jinbidilx il-proporzjon ta' volum ta' ilma/naqal.

Osservazzjonijiet bijoloġiċi

46. Matul l-espożizzjoni, ir-reċipjenti tat-test għandhom jiġu osservati sabiex tiġi vvalutata viżwalment kwalunkwe differenza fid-dud (eż. l-evitar tan-naqal, gerbub tal-ippurgar viżibbli fuq wiċċ in-naqal) meta mqabbel mal-kontrolli. L-osservazzjonijiet għandhom jiġu rreġistrati.

47. Fi tmiem it-test, kull replikat jiġi eżaminat (reċipjenti addizzjonali ddisinjati għall-analiżijiet tas-sustanzi kimiċi jistgħu jiġu esklużi mill-eżaminazzjoni). Għandu jintuża metodu xieraq biex jiġi rkuprat id-dud kollu mir-reċipjent tat-test. Għandha tingħata attenzjoni li d-dud kollu jiġi rkuprat mingħajr ma jweġġa'. Metodu possibbli partikolari huwa li d-dud jingħadda permezz ta' passatur min-naqal. Tista' tintuża xibka tal-azzar inossidabbli b'daqs xieraq tax-xibka. Il-parti l-kbira tal-ilma tal-madwar jitferra' b'attenzjoni, u n-naqal li jifdal u l-ilma jiġi aġitat biex jirriżulta f'sospensjoni magħquda, li jista' jingħadda mill-passatur. Permezz ta' xibka ta' 500 µm, il-parti l-kbira tal-frak tan-naqal sejjer jgħaddi mill-passatur malajr; madankollu, l-għarbil għandu jsir malajr, sabiex id-dud ma jkunx jista' jitkaxkar fix-xibka jew minn ġo fiha. Permezz ta' xibka ta' 250 µm, id-dud mhux sejjer ikun jista' jixkaxkar fix-xibka jew minn ġo fiha; madankollu, għandha tingħata attenzjoni biex kemm jista' jkun ftit frak tan-naqal jinżamm fuq ix-xibka. Is-sospensjoni magħquda li tingħadda minn passatur ta' kull reċipjent tar-replikat tista' tingħadda mill-passatur għal darb'oħra sabiex jiġi żgurat l-irkupru tad-dud kollu. Metodu alternattiv jista' jkun it-tishin tan-naqal billi r-reċipjenti tat-test jitqiegħdu f'banjumarija f'50 — 60 °C; id-dud sejjer jitlaq min-naqal u jista' jinġabar minn wiċċ in-naqal permezz ta' pipetta b'fetħa wiesgħa illostrata bin-nar. Metodu alternattiv ieħor jista' jkun li tiġi prodotta sospensjoni magħquda tan-naqal u din titferra' f'dixx baxx ta' daqs xieraq. Mis-saff baxx ta' sospensjoni magħquda, id-dud jista' jinġabar permezz ta' labra tal-azzar jew pinzetta tal-arloġġiera (li għandha tintuża bħala furketta iktar milli pinzetti biex tiġi evitata ħsara fid-dud) u jiġu ttrasferiti lejn ilma nadif. Wara li d-dud jiġi sseparat mis-sospensjoni magħquda tan-naqal, dan jitlaħlaħ fil-midjum tat-test u jingħadd.

48. Indipendentement mill-metodu użat, il-laboratorji għandhom juru li l-persunal tagħhom jista' jirkupra medja ta' mill-inqas 90 % tal-organiżmi min-naqal kollu. Pereżempju, numru partikolari ta' organiżmi tat-test

▼M6

jista' jiżdied man-naqal ta' kontroll jew in-naqal tat-test, u l-ikupru jista' jiġi ddeterminat wara siegħa (7).

49. In-numru totali ta' individwi ħajjin u mejtin għal kull replikat għandu jiġi rreġistrat u vvalutat. Il-gruppi li ġejjin ta' dud huma kkunsidrati mejtin:

a) ma jkun hemm ebda reazzjoni wara stimulu mekkaniku bil-mod

b) ikun hemm sinjali ta' dekompożizzjoni (flimkien ma' "a")

c) għadd ta' dud nieqes

Barra minn hekk, id-dud ħaj jista' jiġi assenjat għal wieħed minn tliet gruppi:

a) dud sħiħ kbir (adult) mingħajr partijiet tal-ġisem riġenerati

b) dud sħiħ b'partijiet tal-ġisem riġenerati, b'kulur iktar ċar (jiġifieri, b'parti ta' wara ġdida, b'parti ta' quddiem ġdida, jew biż-żewġ partijiet ġodda)

c) dud mhux sħiħ (jiġifieri, dud frammentat reċentement b'partijiet tal-ġisem mhux riġenerati)

Dawn l-osservazzjonijiet addizzjonali mhumiex obbligatorji, iżda jistgħu jintużaw għall-interpretazzjoni tar-riżultati bijoloġiċi (pereżempju, numru ikbar ta' dud assenjat lill-grupp ċ jista' jindika dewmien fir-riproduzzjoni jew ir-riġenerazzjoni fi trattament partikolari). Barra minn hekk, jekk tiġi osservata kwalunkwe differenza fid-dehra (eż. feriti tal-qoxra, partijiet tal-ġisem edematużi) bejn id-dud ittrattat u dak tal-kontroll, dawn għandhom jiġu rreġistrati.

50. Eżattament wara l-għadd/valutazzjoni, id-dud ħaj misjub f'kull replikat jiġi ttrasferit f'dixxijiet ta' użin mnixxfa, imwieżna minn qabel u ttikkettati (wieħed għal kull replikat), u maqtula permezz ta' qatra ta' etanol għal kull dixx ta' użin. Id-dixxijiet ta' użin jitqiegħdu f'forn tat-tnixxif f'temperatura ta' 100 ± 5 °C biex jinxfu matul il-lejl, li jintiżnu wara li jitberrdu f'dessikatur, (preferibbilment fi grammi, tal-inqas b'4 numri wara l-punt deċimali).

51. Minbarra l-piż xott totali, il-piż xott mingħajr irmied jista' jiġi ddeterminat kif deskritt f'(49) sabiex jitqiesu l-komponenti inorganiċi li joriġinaw minn naqal inġestit misjuba fil-passaġġ alimentari tad-dud.

52. Il-bijomassa hija ddeterminata bħala l-bijomassa totali għal kull replikat li jinkludi dud adult u ta' età żgħira. Id-dud mejjet ma għandux jitqies għad-determinazzjoni tal-bijomassa għal kull replikat.

Verifika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test

Kampjunar

53. Għandhom jittieħdu tal-inqas kampjuni għall-analiżi kimika tas-sustanza kimika tat-test tal-ogħla konċentrazzjoni u waħda iktar baxxa, tal-inqas fi tmiem il-fażi ta' ekwilibrazzjoni (qabel iż-żieda tal-organiżmi tat-test), u tal-inqas fi tmiem it-test. Tal-inqas in-naqal aggregat u l-ilma tal-madwar għandhom jiġu kkampjunati għall-analiżi. Għandhom jittieħdu tal-inqas żewġ kampjuni għal kull matriċi u trattament f'kull data tal-kampjunar. Wieħed mill-kampjuni tad-duplikati jista' jinħażen bħala riżerva (li għandha tiġi analizzata eż. f'każ li l-analiżi inizjali ma taqax fil-medda ± 20 % mill--konċentrazzjoni nominali). F'każ ta' proprjetajiet kimiċi speċifiċi, eż. jekk tkun mistennija degradazzjoni rapida tas-sustanza kimika tat-test, l-iskeda

▼M6

analitika tista' tiġi rfinata (eż. kampjunar iktar frekwenti, analiżi ta' iktar livelli ta' konċentrazzjoni) abbażi ta' ġudizzju espert. Imbagħad jistgħu jittieħdu kampjuni f'dati ta' kampjunar intermedji (eż. fis-seba' jum wara l-bidu tal-espożizzjoni).

54. L-ilma sovrastanti għandu jiġi kkampjunat b'dekantazzjoni jew billi l-ilma tal-madwar jingħadda b'attenzjoni f'sifun biex b'hekk titnaqqas il-perturbazzjoni tan-naqal. Il-volum tal-kampjuni għandu jiġi rreġistrat.

55. Wara li l-ilma sovrastanti jkun tneħħa, in-naqal għandu jiġi omoġenizzat u ttrasferit lejn kontenitur xieraq. Il-piż tal-kampjun tan-naqal imxarrab jiġi rreġistrat.

56. Jekk tkun meħtieġa wkoll analiżi tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma interstizjali, il-kampjuni tan-naqal omoġenizzati u ppeżati għandhom jiġu ċentrifugati biex jinkiseb l-ilma interstizjali. Pereżempju, madwar 200 ml min-naqal imxarrab jista' jimtela f'bekkijiet taċ-ċentrifugazzjoni ta' 250 ml. Minn hemm 'il quddiem, il-kampjuni għandhom jiġu ċċentrifugati mingħajr filtrazzjoni biex jiġi iżolat l-ilma interstizjali, eż. f'10 000 ± 600 × *g* għal 30 — 60 min f'temperatura li ma taqbiżx it-temperatura użata fit-test. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, is-supernatant jitferra' jew jisseffed, filwaqt li tingħata attenzjoni biex ma jiġi introdott ebda frak tan-naqal, u l-volum jiġi rreġistrat. Il-piż tal-gerbub tan-naqal li jifdal jiġi rreġistrat. Dan jista' jiffaċilita l-istima tal-bilanċ tal-massa jew l-irkupru ta-sustanza kimika tat-test fis-sistema tal-ilma/naqal, jekk il-piż xott tan-naqal jiġi ddeterminat f'kull data ta' kampjunar. F'xi każijiet, jaf ma jkunx possibbli li jiġu analizzati l-konċentrazzjonijiet fl-ilma interstizjali peress li l-kampjun tad-daqs ikun zgħir wisq.

57. Jekk ma ssirx analiżi minnufih, il-kampjuni kollha għandhom jinħażnu b'metodu xieraq, eż. fil-kundizzjonijiet ta' ħżin rakkomandati għal degradazzjoni minima tas-sustanza kimika tat-test partikolari (eż. kampjuni ambjentali ġeneralment jinħażnu f'– 18 °C fid-dlam). Ikseb informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet ta' ħżin xierqa għas-sustanza kimika tat-test partikolari — pereżempju d-durata u t-temperatura tal-ħżin, il-proċeduri ta' estrazzjoni, eċċ. — qabel ma tibda l-istudju.

Metodu analitiku

58. Peress li l-proċedura sħiħa hija essenzjalment irregolata mill-eżattezza, il-preċiżjoni u s-sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza kimika tat-test, iċċekkja b'mod sperimentali li l-preċiżjoni u r-riproduċibbiltà tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test minn kampjuni tal-ilma u tan-naqal huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari tal-inqas fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Barra minn hekk, iċċekkja li s-sustanza kimika tal-ittesjtar mhijiex identifikabbli fil-kompartimenti ta' kontroll f'konċentrazzjonijiet ogħla mil-limitu ta' kwantifikazzjoni. Jekk ikun meħtieġ, ikkoreġi l-konċentrazzjonijiet nominali għall-irkupri taż-żidiet ta' kontroll tal-kwalità (eż. fejn l-irkupru ma jaqax taħt 80 — 120 % tal-ammont miżjud). Immaniġġja l-kampjuni kollha matul it-test b'tali mod li titnaqqas il-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw mill-adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test fl-apparat tal-kampjunar).

59. Għandhom jiġu rreġistrati u rrapportati l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, u l-limitu ta' detezzjoni fin-naqal u l-ilma.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

60. Il-varjabbli ta' rispons obbligatorji ewlenin tat-test li għandhom jiġu evalwati statistikament huma l-bijomassa u n-numru totali ta' dud għal kull replikat. B'mod fakultattiv, jistgħu jiġu evalwati wkoll ir-riproduzzjoni (bħala żieda fin-numru ta' dud) u t-tkabbir (bħala żieda fil-bijomassa xotta). F'dan il-każ, għandha tinkiseb stima tal-piż xott tad-dud fil-bidu tal-espożizzjoni eż. bil-kejl tal-piż xott ta' sottokampjun rappreżentattiv tal-lott tad-dud sinkronizzat li għandu jintuża għat-test.

▼M6

61. Għalkemm il-mortalità mhijiex punt ta' tmiem ta' dan it-test, il-mortalitajiet għandhom jiġu evalwati kemm jista' jkun. Sabiex jiġu stmati l-mortalitajiet, in-numru ta' dud li ma jkollhomx reazzjoni għal stimulu mekkaniku bil-mod jew urew sinjali ta' dekompożizzjoni, u d-dud nieqes għandhom jiġu kkunsidrati mejta. Il-mortalijiet għandhom tal-inqas jiġu rreġistrati u kkunsidrati meta jiġu interpretati r-riżultati tat-test.

62. Il-konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom jiġu espressi bħala mg/kg ta' piż xott tan-naqal. Jekk l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test imkejla fin-naqal, jew fin-naqal u l-ilma tal-madwar fil-bidu tal-espożizzjoni, huwa bejn 80 % u 120 % tal-konċentrazzjonijiet nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett (EC_x, NOEC, LOEC) jistgħu jiġu espressi abbażi ta' konċentrazzjonijiet nominali. Jekk l-irkupru jiddevja mill-konċentrazzjonijiet nominali b'iktar minn ± 20 % tal-konċentrazzjonijiet nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett (EC_x, NOEC, LOEC) għandhom ikunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla fil-bidu tal-espożizzjoni, eż. billi jitqies il-bilanċ tal-massa tas-sustanza kimika tat-test fis-sistema tat-test (ara l-paragrafu 30). F'dawn il-każijiet, tista' tinkiseb informazzjoni addizzjonali mill-analiżi tas-soluzzjonijiet ewlenin u/jew tal-applikazzjoni sabiex jiġi kkonfermat li n-naqal tat-test kien ippreparat sew.

EC_x

63. Valuri EC_xg għall-parametri deskritti fil-paragrafu 60 huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni loġistika jew Weibull, metodu Spearman-Karber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi). F'(15) u (50) tingħata gwida dwar l-evalwazzjoni statistika. EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC_{50} jew kwalunkwe EC_x, il-medji għal kull trattament ($\overline{X}$) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-rigressjoni.

NOEC/LOEC

64. Jekk analiżi statistika hija maħsuba biex tiddetermina l-NOEC/LOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa. B'mod ġenerali, l-effetti avversi tal-oġġett tat-test meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (iżgħar) bi tmiem wieħed f'$p \leq 0,05$. Eżempji jingħataw fil-paragrafi li ġejjin. F'(15) u (50) tingħata gwida dwar is-selezzjoni ta' metodi statistiċi xierqa.

65. Id-distribuzzjoni normali tad-dejta tista' tiġi ttestjata eż. bit-test tat-tjubija tal-adattament ta' Kolmogorov-Smirnov, it-test tal-Proporzjon ta' devjazzjoni tal-medda mill-istandard (test R/s) jew it-test Shapiro-Wilk (b'żewġ naħat, $p \leq 0,05$). Biex tiġi ttestjata l-varjanza tal-omoġenità jistgħu jintużaw it-test ta' Cochran, it-test ta' Levene jew it-test ta' Bartlett, (b'żewġ naħat, ($p \leq 0,05$). Jekk il-prerekwiżiti tal-proċeduri tal-ittestjar parametriċi (in-normalità, l-omoġenità tal-varjanza) jiġu ssodisfati, tista' titwettaq Analiżi tal-Varjanza (ANOVA) b'Direzzjoni waħda u testijiet ta' tqabbil b'diversi paraguni sussegwenti. Paraguni f'koppji (eż. test-t ta' Dunnett) jew testijiet tat-tendenza rigressiva (eż. test ta' Williams) jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi sinifikanti ($p \leq 0,05$) bejn il-kontrolli u d-diversi konċentrazzjonijiet tal-punti tat-test. Inkella, għandhom jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. it-test-U ta' Bonferroni skont it-test ta' tendenza ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) biex jiġu ddeterminati l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

66. Jekk isir test tal-limitu (tqabbil tal-kontroll u kura waħda biss) u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri tal-ittestjar parametriku (in-normalità, l-omoġenità), ir-risponsi metriċi (numru totali ta' dud, u l-bijomassa bħala piż xott tad-dud) jistgħu jiġu evalwati mit-Test tal-istudenti (test-t). Jista' jintuża t-test-t tal-varjanza mhux ugwali (test-t ta' Welch) jew test mhux parametriku, bħat-test-U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati. Fl-Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipoteżi fir-ring test tal-metodu.

▼M6

67. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Interpretazzjoni tar-riżultati

68. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'attenzjoni, jekk kien hemm devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar, u fejn jistgħu jseħħu konċentrazzjonijiet imkejla tal-konċentrazzjonijiet tat-test f'livelli qrib il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu analitiku użat. Kwalunkwe devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ttestjar għandha tiġi nnotata.

Rapport tat-test

69. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas l-informazzjoni li ġejja:

— *Sustanza kimika tat-test:*

— dejta tal-identifikazzjoni tas-sustanza kimika (isem komuni, isem kimiku, formula strutturali, numru CAS, eċċ.) inklużi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test; sors tas-sustanza kimika tat-test, identità u konċentrazzjoni ta' kwalunkwe solvent użat.

— kwalunkwe informazzjoni disponibbli dwar in-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi kif miksub qabel il-bidu tat-test, (eż. is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-koeffiċjent tal-partizzjoni fil-ħamrija (jew fin-naqal, jekk ikun disponibbli), il-log K_{ow}, l-istabbiltà fl-ilma, eċċ.);

— *Speċijiet tat-test:*

— ismijiet xjentifiċi, sors, kwalunkwe trattament minn qabel, akklimazzjoni, kundizzjonijiet tal-kulturi, eċċ.

— *Kundizzjonijiet tat-test:*

— proċedura tal-ittestjar użata (statika, semistatika jew bi fluss kontinwu);

— id-disinn tat-test (eż. in-numru, il-materjal u d-daqs tal-kontenituri tat-test, il-volum ta' ilma għal kull reċipjent, il-massa tan-naqal u l-volum għal kull reċipjent, (għal proċeduri bi fluss kontinwu jew semistatiċi: ir-rata ta' sostituzzjoni tal-volum tal-ilma), kwalunkwe arjazzjoni użata qabel u matul it-test, in-numru ta' repliki, in-numru ta' dud għal kull replikat fil-bidu tal-espożizzjoni, in-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, it-tul tal-kundizzjonament, l-ekwilibriju u l-perjodi ta' espożizzjoni, il-frekwenza ta' kampjunar);

— fond tan-naqal u l-ilma tal-madwar;

— metodu tat-trattament minn qabel bis-sustanza kimika tat-test u żieda/applikazzjoni;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, id-dettalji dwar il-kampjunar għall-analiżi tas-sustanzi kimiċi, u l-metodi analitiċi li permezz tagħhom inkisbu l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test;

— il-karatteristiċi tan-naqal kif deskritt fil-paragrafi 24 — 25, u kwalunkwe kejl ieħor li jittieħed; it-tħejjija tan-naqal formulat;

— it-tħejjija tal-ilma tal-ittestjar (jekk jintuża ilma rikostitwit) u l-karatteristiċi (l-ossiġenu, il-konċentrazzjoni, il-pH, il-konduttività, l-ebusija, u kwalunkwe kejl ieħor li jittieħed) qabel il-bidu tat-test;

— informazzjoni ddettaljata dwar it-tagħlif inkluż it-tip ta' ikel, it-tħejjija, l-ammont u r-reġim ta' tagħlif;

▼M6

— intensità tad-dawl u fotoperjodu/fotoperjodi;

— metodi użati għad-determinazzjoni tal-parametri bijoloġiċi kollha (eż. kampjunar, spezzjoni, ippeżar tal-organiżmi tat-test) u l-parametri abijotiċi kollha (eż. parametri tal-kwalità tal-ilma u n-naqal);

— volumi u/jew piżijiet tal-kampjuni kollha għall-analiżijiet tas-sustanzi kimiċi;

— informazzjoni ddettaljata dwar it-trattament tal-kampjuni kollha għall-analiżi tas-sustanza kimika, inkluż dettalji dwar il-preparazzjoni, il-ħżin, il-proċeduri ta' żieda, l-estrazzjoni, u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sustanza kimika tat-test, u l-irkupri tas-sustanza kimika tat-test.

— *Riżultati:*

— il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test (il-pH, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlula, l-ebusija, il-konċentrazzjonijiet tal-ammonijaka, u kwalunkwe kejl ieħor li ttieħed);

— kontenut ta' karbunju organiku totali (TOC), il-proporzjon ta' piż xott ma' piż imxarrab, il-pH tan-naqal, u kwalunkwe kejl ieħor li ttieħed;

— in-numru totali, u jekk ikun iddeterminat, numru ta' dud sħiħ u mhux sħiħ f'kull kompartiment tal-ittestjar fi tmiem l-ittestjar;

— il-piż xott tad-dud ta' kull kompartiment tat-test fi tmien it-test, u jekk jitkejjel, il-piż xott ta' sottokampjun tad-dud fil-bidu tat-test;

— kwalunkwe imġiba anormali osservata bi tqabbil mal-kontrolli (eż. evitar tan-naqal, il-preżenza jew in-nuqqas ta' gerbub tal-ippurgar);

— kwalunkwe mortalità osservata;

— stimi tal-punti ta' tmiem tossiċi (eż. EC_x, NOEC u/jew LOEC), u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-konċentazzjonijiet tat-test imkejla u r-riżultati tal-analiżijiet kollha biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test;

— kwalunkwe devjazzjoni mill-kriterji ta' validità.

— *Evalwazzjoni tar-riżultati:*

— konformità tar-riżultati mal-kriterji ta' validità kif elenkat fil-paragrafu 13;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

(1) KE (2003). Dokument ta' Gwida Teknika b'appoġġ għad-Direttiva tal-Kummissjoni 93/67/KEE dwar il-Valutazzjoni tar-Riskju għal sustanzi ġodda nnotifikati, ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1488/94 dwar il-Valutazzjoni tar-Riskju għal sustanzi eżistenti u d-Direttiva 98/8/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar it-tqegħid fis-suq tal-prodotti bijoċidali; Parti I — IV. L-Uffiċċju għall-Pubblikazzjonijiet Uffiċjali tal-KE (Kummissjoni Ewropea), il-Lussemburgu.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, "Test tat-tossiċità bil-kironomidi tal-ilma-naqal bl-użu ta' naqal miżjud".

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

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

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼M6

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta.

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼**M6**

(50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. Marzu 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Letteratura addizzjonali dwar il-proċeduri statistiċi:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Il-**perjodu ta' kundizzjonament** jintuża biex jistabbilizza l-komponent mikrobjali tan-naqal u biex eż. titneħħa l-ammonja li toriġina mill-komponenti tan-naqal; dan iseħħ qabel iż-żieda tas-sustanza kimika tat-test man-naqal. Ġeneralment, l-ilma tal-madwar jintrema wara l-kundizzjonament.

L-$\mathbf{EC_x}$ hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fin-naqal li tirriżulta f'effett ta' X % (eż. 50 %) fuq il-parametru bijoloġiku fi żmien perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat.

Il-**perjodu ta' ekwilibrazzjoni** jintuża biex jippermetti d-distribuzzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn il-fażi solida, l-ilma interstizjali u l-ilma tal-madwar; dan iseħħ wara ż-żieda tas-sustanza kimika tat-test man-naqal u qabel iż-żieda tal-organiżmi tat-test.

Il-**fażi ta' espożizzjoni** huwa ż-żmien li matulu l-organiżmi tat-test jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test.

Naqal ifformulat jew naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintentiku, huwa taħlita ta' materjali użati biex jiġu imitati l-komponenti fiżiċi ta' naqal naturali.

Il-**Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC)** hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test fejn is-sustanza kimika hija osservata għal effett tossiku sinifikanti (b'$p < 0,05$) meta mqabbel mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett ugwali jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Jekk dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlu l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Il-**Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC)** hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taħt l-LOEC li, meta mqabbla mal-kontroll, ma għandha ebda effett statistiku ($p \leq 0,05$), fil-perjodu ta' espożizzjoni.

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma** (K_{ow}; xi drabi espress ukoll bħala P_{ow}) huwa l-proporzjon ta' solubbiltà ta' sustanza kimika f'ottanol-n u fl-ilma f'ekwilibriju u jirrappreżenta l-lipofiliċità ta' sustanza kimika (Kapitolu A.24 ta' dan l-Anness). Il-K_{ow} jew il-logaritmu ta' K_{ow} (log K_{ow}) jintuża bħala indikazzjoni tal-potenzjal ta' kimika għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organiżmi akwatiċi.

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni organika karbonju-ilma** (K_{oc}) huwa l-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' kimika fi/fuq il-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-kimika fl-ilma f'ekwilibriju.

Ilma tal-madwar huwa l-ilma li jkopri n-naqal fir-reċipjent tat-test.

Ilma interstizjali huwa l-ilma li jokkupa spazju bejn in-naqal jew il-frak tal-ħamrija.

Naqal miżjud huwa naqal li miegħu żdiedet sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼**M6**

Appendiċi 2

Kompożizzjoni tal-ilma rikostitwit rakkomandat

(adottat mill-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness (1))

(a) *Soluzzjoni ta' klorur tal-kalċju*

Ħoll 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(b) *Soluzzjoni tas-sulfat tal-manjeżju*

Ħoll 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(c) *Soluzzjoni tal-idroġenu karbonat tas-sodju*

Ħoll 2,59 g $NaHCO_3$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(d) *Soluzzjoni tal-klorur tal-potassju*

Ħoll 0,23 g KCl f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

Is-sustanzi kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

Il-konduttività tal-ilma distillat jew dejonizzat ma għandhiex taqbeż 10 μScm^{-1}.

jitħalltu 25 ml kull wieħed ta' soluzzjonijiet (a) sa (d) u l-volum totali li jiżdied sa 1 l b'ilma dejonizzat. It-totali tal-joni tal-kalċju u l-manjeżju f'dawn is-soluzzjonijiet hija ta' 2,5 mmol/l.

Il-proporzjon ta' joni Ca:Mg huwa ta' 4:1 u ta' joni Na:K huwa ta' 10:1. Il-kapaċità tal-aċidu $K_{S4.3}$ ta' din is-soluzzjoni hija 0,8 mmol/l.

Żid l-arja mal-ilma dilwit sakemm tintlaħaq is-saturazzjoni tal-ossiġenu, imbagħad aħżnu għal madwar jumejn mingħajr arjazzjoni ulterjuri qabel l-użu.

REFERENZA

(1) Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Test tat-Tossiċità Akuta fil-Ħut.

▼**M6**

Appendiċi 3

Karatteristiċi fiżiko-kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli

Komponent	Konċentrazzjonijiet
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 µg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 µg/l
Klorin residwu	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l
(adottata minn OECD (1992) (1))	

REFERENZA

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼M6

Appendiċi 4

Naqal artifiċjali rakkomandat — gwida dwar il-preparazzjoni u l-użu

Kostitwenti tan-naqal

Kostitwent	Karatteristiċi	% tan-naqal piż xott
Pit	*Pit ta' sfanju, grad ta' dekompożizzjoni*: "*midjum*", *imnixxef bl-arja, l-ebda fdalijiet tal-pjanta viżibbli, mitħun irqiq (daqs tal-frak ≤ 0,5 mm)*	5 ± 0,5
Ramel kwarzuż	Daqs tal-frak: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-frak għandu jkun fil-medda ta' 50-200 µm	75 — 76
Tafal tal-kawlina	*Kontenut ta' kawlinite ≥ 30 %*	20 ± 1
Sors ta' ikel	*eż. Trab tal-Urtica (Folia urticae), weraq ta' Urtica dioica (ħurrieq), mitħuna rqaq (daqs tal-frak ≤ 0,5 mm); skont l-istandards tal-farmaċija, għall-konsum mill-bniedem; flimkien man-naqal xott*	0,4 — 0,5 %
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda ta' pit u ramel	2 ± 0,5
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$, polverizzat, kimikament pur, flimkien man-naqal xott	0,05 — 1
Ilma Dejonizzat	Konduttività ≤ 10 µS/cm, flimkien man-naqal xott	30 — 50

Nota: Jekk ikunu mistennija konċentrazzjonijiet ta' ammonijaka għoljin, eż. jekk is-sustanza kimika tat-test tkun magħrufa li tinibixxi n-nitrifikazzjoni, jaf ikun utli li tissostitwixxi 50 % tat-trab tal-urtica b'ħafna nitroġenu b'ċelluloża (eż. trab ta' Celluloża-a, kimikament pur, daqs tal-frak ≤ 0,5 mm; (1) (2)).

Preparazzjoni

Il-pit jitnixxef bl-arja u mitħun għal trab irqiq. Tiġi ppreparata sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat permezz ta' apparat ta' omoġenizzazzjoni bi prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni huwa aġġustat għal 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni hija kundizzjonata għal tal-inqas jumejn billi titħawwad bil-mod f'20 ± 2 °C, biex jiġi stabbilizzat komponent mikrobjali stabbli. Il-pH jerġa' jitkejjel u għandu jkun 6,0 ± 0,5. Imbagħad is-sospensjoni tal-pit titħallat ma' kosistwenti oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ilma dejonizzat biex jinkiseb naqal omoġenju b'kontenut ta' ilma f'medda ta' 30–50 fil-mija ta' piż xott tan-naqal. Il-pH tat-taħlita finali jerġa' jitkejjel u jiġi aġġustat bejn 6,5 u 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun meħtieġ. Madankollu, jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonijaka, jaf ikun utli li l-pH tan-naqal jinżamm inqas minn 7,0 (eż. bejn 6,0 u 6,5). Jittieħdu kampjuni tan-naqal biex jiġi ddeterminat il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonja, in-naqal formulat jaf ikun kundizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jipprevalu fit-test sussegwenti (eż. proporzjon ta' naqal/ilma 1:4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test) qabel ma tiżdied is-sustanza kimika tat-test, jiġifieri għandu

▼**M6**

jiżdied bl-ilma, li għandu jiġi arjat. Fi tmiem dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Minn hemm 'il quddiem, ir-ramel kwarzuż miżjud jitħallat man-naqal għal kull livell ta' trattament, in-naqal jiġi distribwit fir-reċipjenti tat-test tar-repliki, u miżjud mal-ilma tat-test. Imbagħad ir-reċipjenti jiġu inkubati fl-istess kundizzjonijiet li jipprevalu fit-test sussegwenti. Dan huwa fejn jibda il-perjodu ta' ekwilibriju. L-ilma tal-madwar għandu jiġi arjat.

Is-sors ta' ikel magħżul għandu jiżdied qabel jew matul iż-żieda tan-naqal bis-sustanza kimika tat-test. Dan jista' inizjalment jitħallat mas-sospensjoni tal-pit (ara hawn fuq). Madankollu, degradazzjoni eċċessiva tas-sors tal-ikel qabel iż-żieda tal-organiżmi tal-ittestjar — eż. fil-każ ta' perjodu ta' ekwilibriju twil, tista' tiġi evitata billi l-perjodu ta' żmien bejn iż-żieda tal-ikel u l-bidu ta' espożizzjoni jinżamm kemm jista' jkun qasir. Sabiex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test tiżdied mal-ikel, is-sors tal-ikel għandu jitħallat bin-naqal mhux iktar tard mill-jum meta s-sustanza kimika tat-test tiżdied man-naqal.

Ħżin

Il-kostitwenti xotti tan-naqal artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post xott u frisk jew f'temperatura tal-kamra. In-naqal ippreparat miżjud bis-sustanza kimika tat-test għandu jintuża fit-test immedjatament. Il-kampjuni tan-naqal miżjud jistgħu jinħażnu fil-kundizzjonijiet rakkomandanti għas-sustanzi kimiċi tat-test partikolari sal-analiżi.

REFERENZI

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. Marzu 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

▼M6

Appendiċi 5

Metodi ta' kulturi għal lumbriculus variegatus

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbrikulidi, Oligoċaeta huwa abitant tan-naqal tal-ilma ħelu u jintuża ħafna fl-ittestjar ekotossikoloġiku. Jista' jiġi kkulturat faċilment f'kundizzjonijiet tal-laboratorju. F'dan li ġej tingħata deskrizzjoni tal-metodi ta' kulturi.

Metodi ta' kulturi

Il-kundizzjonijiet ta' kulturi għal *Lumbriculus variegatus* huma deskritti fid-dettall f'Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Hawn taħt jingħata sommarju fil-qosor ta' dawn il-kundizzjonijiet. Vantaġġ ewlieni ta' *L. variegatus* huwa r-riproduzzjoni rapida tiegħu, li tirriżulta f'bijomassa li tiżdied malajr f'popolazzjonijiet ikkulturati fil-laboratorju (eż. (1), (3), (4), (5)).

Id-dud jista' jiġi kkulturat f'akkwarji kbar (57 — 80 l) f'23 °C b'fotoperjodu ta' 16 L:8 D (100 — 1 000 lx) permezz ta' ilma naturali mġedded kuljum (45 — 50 l għal kull akkwarju). Is-sottostrat huwa ppreparat billi jitqatgħu srievet tal-karti kannella mhux ibbliċjati fi strixxi, li mbagħad jistgħu jitħalltu mal-ilma tal-kulturi għal ftit sekondi biex jirriżultaw f'biċċiet żgħar tas-sottostrat tal-karta. Dan is-sottostrat imbagħad jista' jintuża direttament fl-akkwarji tal-kultura*Lumbriculus* billi titgħatta ż-żona ta' qiegħ it-tank, jew jinħażen iffriżat f'ilma dejonizzat biex jintuża iktar tard. Sottostrat ġdid fit-tank sejjer ġeneralment idum għal madwar xahrejn.

Kull kultura tad-dud, tinbeda b'500 — 1 000 dudu, u tingħalef sospensjoni ta' 10 ml li fiha 6 g ta' ikel tal-bidu tat-trota 3 darbiet fil-ġimgħa f'kundizzjonijiet ta' tiġdid jew bi fluss kontinwu. Kulturi statiċi jew semi statiċi għandhom jirċievu rati ta' tagħlif iktar baxxi biex jiġi evitat tkabbir batterjali u fungali.

F'dawn il-kundizzjonijiet, in-numru ta' individwi fil-kultura, is-soltu jirdoppja f'madwar 10 sa 14-il jum.

Inkella *Lumbriculus variegatus* jista' jiġi kkulturat f'sistema li tikkonsisti minn saff ta' ramel kwarzuż kif użat għan-naqal artifiċjali (fond ta' 1 — 2 cm), u ilma rikostitwit. Kontenituri tal-ħġieġ jew l-azzar inossidabbli b'għoli ta' 12 sa 20 cm jistgħu jintużaw bħala reċipjenti tal-kulturi. Il-korp tal-ilma għandu jkun arjat bil-mod (eż. 2 bżieżaq fis-sekonda) permezz ta' pasteur pipette pożizzjonata madwar 2 cm 'il fuq minn wiċċ in-naqal. Biex tiġi evitata akkumulazzjoni eż. tal-ammonijaka, l-ilma tal-madwar għandu jiġi skambjat permezz ta' sistema bi fluss kontinwu, jew, tal-inqas darba f'ġimgħa, manwalment. L-oligoċaeti jistgħu jinżammu f'temperatura tal-kamra b'fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl (intensità ta' 100 — 1 000 lx) u 8 sigħat dlam. Fil-kultura semistatika (tiġdid tal-ilma darba f'ġimgħa), id-dud jintgħalef b'TetraMin darbtejn f'ġimgħa (eż. 0,6 — 0,8 mg għal kull cm^2 ta' wiċċ tan-naqal), li jista' jiġi applikat bħala sospensjoni ta' 50 mg TetraMin għal kull ml ta' ilma dejonizzat.

Lumbriculus variegatus jista' jitneħħa mill-kulturi eż. bit-trasferiment tas-sottostrat b'xibka irqiqa, jew organiżmi permezz ta' pipetta tal-ħġieġ bi ftuħ wiesgħa (dijametru ta' madwar 5 mm) illustrata bin-nar, lejn bekk separat. Jekk sottostrat jiġi ttrasferit lejn dan il-bekk, il-bekk li fih id-dud u s-sottostrat jitħalla għal matul il-lejl f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu, li sejrin ineħħu s-sottostrat mill-bekk, filwaqt li d-dud jibqa' f'qiegħ ir-reċipjent. Dawn jistgħu jiġu introdotti f'tankijiet ta' kulturi li għadhom kif jiġu ppreparati, jew ipproċessati iktar kif deskritt f'(3) u (4), jew f'dan li ġej.

Kwistjoni li għandha titqies kritika meta jintuża *L. variegatus* f'testijiet tan-naqal huwa l-mod ta' riproduzzjoni tiegħu (arkitomija jew morfallassi, eż. (6)). Din ir-riproduzzjoni asesswali tirriżulta f'żewġ frammenti, li ma jiklux għal ċertu perjodu sakemm ma tiġi ġġenerata l-parti ta' quddiem jew ta' wara (eż. (7), (8)). Dan ifisser li l-espożizzjoni ta' *L. variegatus* permezz ta' inġestjoni ta' naqal ikkontaminat ma sseħħx kontinwament.

▼**M6**

Għalhekk, għandha titwettaq sinkronizzazzjoni biex jitnaqqsu r-riproduzzjoni u r-riġenerazzjoni mhux ikkontrollati, u l-varjazzjoni għolja sussegwenti fir-riżultati tat-test. Tali varjazzjoni tista' sseħħ meta xi individwi, li fframmentaw u għalhekk ma jieklux għal ċertu perjodu ta' żmien, ikunu inqas esposti għas-sustanza kimika tat-test minn individwi oħra, li ma jifframmentawx matul it-test (9), (10), (11). 10 sa 14-il jum qabel il-bidu tal-espożizzjoni, id-dud għandu jiġi fframmentat b'mod artifiċjali (sinkronizzazzjoni). Id-dud (adult) kbir, li preferibbilment ma juri ebda sinjal ta' morfallassi riċenti għandu jintgħażel gias-sinkronizzazzjoni. Dan id-dud jista' jitqiegħed fuq slajd tal-ħġieġ f'taqtira ta' ilma tal-kultura, u mifrud fil-parti tal-ġisem medjana bi skalpell. Għandha tingħata attenzjoni li t-truf ta' wara jkunu ta' daqs simili. It-truf ta' wara mbagħad għandhom jitħallew jirriġeneraw irjus ġodda f'reċipjent tal-kultura li fih l-istess sottostrat kif użat fil-kultura u l-ilma rikostitwit sal-bidu tal-espożizzjoni. Ir-riġenerazzjoni ta' rjus ġodda hija indikata meta d-dud sinkronizzat ikun qiegħed iħaffer fis-sottostrat (il-preżenza ta' rjus riġenerati tista' tiġi kkonfermata bl-ispezzjoni ta' sottokampjun rappreżentattiv taħt mikroskopju binokulari). Minn hemm 'il quddiem, l-organiżmi tat-test huma mistennija li jkunu fi stat fiżjoloġiku simili. Dan ifisser, li meta r-riproduzzjoni b'morfallassi sseħħ f'dud sinkronizzat matul it-test, virtwalment l-annimali kollha huma mistennija li jkunu esposti bl-istess mod għan-naqal miżjud. It-tagħlif tad-dud sinkronizzat għandu jsir malajr kemm jista' jkun wara li d-dud jibda jħaffer fis-sottostrat, jew 7 ijiem wara d-dissezzjoni. Ir-reġim ta' tagħlif għandu jkun komparabbli mal-kulturi regolari, iżda huwa rakkomandabbli li d-dud sinkronizzat jintgħalef bl-istess sors ta' ikel li għandu jintuża fit-test. Id-dud għandu jinżamm fit-temperatura tal-ittestjar f'20 ± 2 °C. Wara r-riġenerazzjoni, id-dud sħiħ intatt, li jkun qiegħed jgħum jew jitkaxkar permezz ta' stimulu mekkaniku bil-mod, għandu jintuża għall-ittestjar. Għanda tiġi evitata ħsara jew awtotomija fid-dud, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illustrati bin-nar, jew apparat dentali ta' qbid tal-azzar inossidabbli għall-immaniġġar ta' dan id-dud.

Sorsi ta' kulturi li jibdew l-fermentazzjoni għal Lumbriculus variegatus (indirizzi fil-forma adottata mill-Istati Uniti (4))

Ewropa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Il-Finlandja

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydro-wissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

Stati Uniti tal-Amerika

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

REFERENZI

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

Appendiċi 6

Sommarju tar-riżultati tar-ringtest

"Test tat-Tossiċità tan-Naqal b'*Lumbriculus variegatus*"

Tabella 1

Riżultati tar-ring test runs individwali: Numru medju ta' dud fil-kontrolli u l-kontrolli tas-solvent fi tmiem it-test; SD=devjazzjoni standard; CV = koeffiċjent ta' varjazzjoni.

	numru medju ta' dud fil-kontrolli	SD	CV (%)	n	numru medju ta' dud fil-kontrolli tas-solvent	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
medja interlabo-ratorja	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min	**16,3**				**15,0**			
mass	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼**M6**

Tabella 2

Riżultati tar-ring test runs individwali: Medja tal-piż xott tad-dud għal kull replikat fil-kontrolli u l-kontrolli tas-solvent fi tmiem it-test; SD=devjazzjoni standard; CV = koeff. ta' varjazzjoni.

	piż xott totali tad-dud għal kull replikat (kontrolli)	SD	CV (%)	n	piż xott totali tad-dud għal kull replikat (kontrolli tas-solvent)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
medja interlabo-ratorja	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min	**12,9**				**10,5**			
mass	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tabella 3

Tossiċità tal-PCP: Sommarju tal-punti ta' tmiem fir-ring test; medji laboratorji għal EC50, NOEC u LOEC; SD = devjazzjoni standard; CV = koeffiċjent ta' varjazzjoni.

parametru bijoloġiku		Medja inter-laboratorja (mg/kg)	min	mass	Fattur interlaboratorju	SD	CV (%)	medja ġeometrika (mg/kg)
numru totali ta' dud:	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
piż xott totali tad-dud	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
mortalità/ sopravivenza	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
riproduzzjoni (żieda fin-numru ta' dud għal kull replikat)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
tkabbir (żieda fil-bijomassa għal kull replikat)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: differenza minima traċċabbli mill-valuri tal-kontroll matul l-ittestjar tal-ipoteżi; użata bħala kejl tas-setgħa statistika

REFERENZA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAD-DUD PREDATORJU (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) FIL-ĦAMRIJA**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 226 tal-OECD (2008). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-ħamrija fuq il-produzzjoni riproduttiva tad-dudu predatorju tal-ħamrija *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), u għal-hekk jippermetti l-istima tal-inibizzjoni ta' rata ta' tkabbir speċifika tal-popolazzjoni (1,2). Il-produzzjoni riproduttiva tfisser in-numru ta' frieħ fi tmiem il-perjodu tal-ittestjar. *H. aculeifer* jirrappreżenta livell trofiku addizzjonali għall-ispeċi li diġà jkunu disponibbli għaliha metodi ta' ttestjar. Test tar-riproduzzjoni mingħajr diskriminazzjoni u kwantifikazzjoni tal-istadji differenti taċ-ċiklu riproduttiv huwa kkunsidrat adegwat għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Għal sustanzi kimiċi b'xenarju ta' espożizzjoni ieħor milli l-ħamrija, l-approċċi tal-ħamrija l-oħra jaf ikunu xierqa (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* huwa kkunsidrat rappreżentant rilevanti tal-fawna tal-ħamrija u d-dud predatorju b'mod partikolari. Huwa mxerred madwar id-dinja (5) u jista' jinġabar u jitrabba faċilment fil-laboratorju. Sommarju tal-bijoloġija ta' *H. aculeifer* huwa pprovdut fl-Appendiċi 7. Hija disponibbli informazzjoni ta' sfond dwar l-ekoloġija tal-ispeċi ta' dud u l-użu f'ittestjar ekotossikoloġiku (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. In-nisa adulti huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallta ma' ħamrija. It-test jinbeda b'10 nisa adulti għal kull reċipjent ta' replikat. L-irġiel ma jiġux introdotti fit-test, peress li l-esperjenza wriet li n-nisa jitgħammru immedjatament jew ftit wara li jfaqqsu mill-istadju ta' dewtonimfa, jekk ikun hemm l-irġiel. Barra minn hekk, l-inklużjoni tal-irġiel, ittawwal it-test b'tali mod li tkun meħtieġa diskriminazzjoni impenjattiva tal-istadji ta' etajiet. Għalhekk, it-tgħammir innifsu mhuwiex parti mit-test. In-nisa jiġu introdotti fit-test 28-35 jum wara l-bidu tal-perjodu ta' bidien fis-sinkronizzazzjoni (ara l-Appendiċi 4), peress in-nisa mbagħad jistgħu jiġu kkunsidrati bħala diġà mgħammrin u li għaddew mill-istadju ta' qabel l-ovipożizzjoni. F'20 °C it-test jintemm fl-14-il jum wara l-introduzzjoni tan-nisa (jum 0), li jippermetti l-ewwel wild ta' kontroll jilħaq l-istadju ta' dewtonimfa (ara l-Appendiċi 4). Għall-varjabbli ewlieni mkejjel, jiġi ddeterminat in-numru ta' frieħ għal kull reċipjent tat-test flimkien man-numru ta' nisa li jibqgħu ħajjin. Il-produzzjoni riproduttiva tad-dud espost għas-sustanza kimika tat-test titqabbel ma' dik tal-kontrolli sabiex tiġi ddeterminata l-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) jew il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet), skont id-disinn sperimentali (ara l-paragrafu 29). Ħarsa ġenerali tal-iskeda tal-ittestjar tingħata fl-Appendiċi 8.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

4. Preferibbilment għandhom ikunu magħrufa s-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma ħamrija u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test. Hija rakkomandabbli informazzjoni addizzjonali dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test, bħar-rati ta' degradazzjoni bijotika u abjotika.

5. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża għal sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. Madankollu, il-mod ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test sejjer ikun differenti skont dan. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

▼M6

VALIDITÀ TAT-TEST

6. Il-kriterji li ġejjin għandhom jiġu stratifikati fil-kontrolli mhux ittrattati għal riżultat tat-test biex jitqies validu:

— Il-medja ta' mortalità tan-nisa adulti ma għandhiex taqbeż l-20 % fi tmiem it-test;

— In-numru medju ta' frieħ għal kull replikat (b'10 nisa adulti introdotti) għandu jkun tal-inqas 50 fi tmiem it-test;

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni kkalkolat għan-numru ta'dud frieħ għal kull replikat ma għandux ikun ogħla minn 30 % fi tmiem it-test finali.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

7. L-ECx u/jew l-NOEC ta' sustanza kimika ta' referenza għandhom jiġu ddeterminati biex jipprovdu assigurazzjoni li l-kundizzjonijiet tat-test fil-laboratorju huma adegwati u biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organiżmi tat-test ma nbidilx maż-żmien. Dimethoate (CAS 60-51-5) huwa sustanza kimika ta' referenza xierqa li uriet li taffettwa d-daqs tal-popolazzjoni (4). L-aċidu boriku (CAS 10043-35-3) jista' jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza alternattiva. Inkisbet inqas esperjenza b'din is-sustanza kimika. Huma possibbli żewġ opzjonijiet ta' disinn:

— Is-sustanza kimika ta' referenza tista' tiġi ttestjata b'mod parallel għad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' kull sustanza kimika tat-test f'konċentrazzjoni partikolari, li għandha tintwera qabel fi studju ta' rispons għad-doża biex tirriżulta f'effett ta' tnaqqis ta' > 50 % ta' wlied. F'dan il-każ, in-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak tal-kontrolli (ara l-paragrafu 29).

— Inkella, is-sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata bejn darba u darbtejn fis-sena f'test ta' rispons għad-doża. Skont id-disinn magħżul, in-numru ta' konċentrazzjonijiet u repliki u l-fattur ta' spazjar ivarjaw (ara l-paragrafu 29), iżda għandu jintlaħaq rispons ta' effett ta' 10 — 90 % (fattur ta' spazjar ta' 1,8). L-EC_{50} għal dimetoat abbażi tan-numru ta' frieħ għandha taqa' fil-medda bejn 3,0 u 7,0 mg a.s./kg ta' ħamrija (piż xott). Abbażi tar-riżultati miksuba bl-aċidu boriku s'issa, l-EC50 ibbażata fuq in-numru ta' frieħ għandha taqa' fil-medda bejn 100 u 500 mg/kg ta' piż xott ta' ħamrija.

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Reċipjenti tat-test u tagħmir

8. Għandhom jintużaw reċipjenti tat-test b'dijametru ta' 3 — 5 cm (għoli ta' ħamrija ta' ≥ 1,5 cm), magħmula bil-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor u li għandhom għatu li jingħalaq sew. L-għotjien bil-kamin huma ppreferuti u f'dak il-każ, ir-reċipjenti jistgħu jiġu arjati darbtejn f'ġimgħa. Inkella, jistgħu jintużaw għotjien li jippermettu skambju gassuż dirett bejn is-sottostrat u l-atmosfera (eż. garża). Peress li l-kontenut ta' umdità għandu jinżamm għoli biżżejjed matul it-test, huwa essenzjali li jiġi kkontrollat il-piż ta' kull reċipjent sperimentali matul it-test u li jerġa' jimtela bl-ilma jekk meħtieġ. Dan jista' jkun speċjalment importanti jekk ma jkunu disponibbli ebda għotjien bil-kamin. Jekk jintuża reċipjent tat-test mhux trasparenti, l-għatu għandu jkun magħmul minn materjal li jippermetti l-aċċess għad-dawl (eż. permezz ta' għatu trasparenti mtaqqab) filwaqt li jevita li d-dud jaħrab. Id-daqs u t-tip tar-reċipjent tat-test jiddependi fuq il-metodu tal-estrazzjoni (ara l-Appendiċi 5 għal dettalji). Jekk tiġi applikata estrazzjoni bis-sħana lir-reċipjent tat-test, allura tista' tiżdied xibka tal-qiegħ b'daqs ta' xibka xieraq (issiġillata sal-estrazzjoni), u l-fond tal-ħamrija għandu jkun suffiċjenti biex jippermetti gradjent tat-temperatura u l-umdità.

▼M6

9. Huwa meħtieġ tagħmir standard tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:

— preferibbilment reċipjenti tal-ħġieġ b'għotjien bil-kamin;

— kabinett tat-tnixxif;

— sterjomikroskopju;

— xkupilji għat-trasferiment tad-dud

— miter tal-pH u luxmetru;

— imwieżen preċiżi xierqa;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni ikunu mgħottija bl-għotjien);

— inkubatur jew kamra żgħira b'kontroll tat-temperatura;

— tagħmir għall-estrazzjoni (ara l-Appendiċi 5) (13)

— pannell tad-dawl fil-għoli b'kontroll tad-dawl

— vażetti tal-ġbir għad-dud estratt.

Preparazzjoni tal-ħamrija artifiċjali

10. Għal dan it-test, tintuża ħamrija artifiċjali. Il-ħamrija artifiċjali tikkonsisti mill-komponenti li ġejjin (il-valuri kollha huma bbażati fuq il-massa xotta):

— 5 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u miżħun irqiq (daqs tal-frak ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli);

— 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);

— madwar 74 % ramel industrijali mnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron. L-ammont eżatt ta' ramel jiddependi fuq l-ammont ta' $CaCO_3$ (ara hawn taħt), flimkien għandhom jagħmlu 75 %.

— < 1,0 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$, polverizzat, grad analitiku) biex jinkiseb pH ta' 6,0 ± 0,5; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiżdied jiddependi prinċipalment fuq il-kwalità/natura tal-pit (ara Nota 1).

Nota 1: L-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ sejjer jiddependi fuq il-komponenti tas-sottostrat tal-ħamrija u għandu jiġi ddeterminat billi jitkejjel il-pH tas-sottokampjuni tal-ħamrija eżattament qabel it-test (14).

Nota 2: Il-kontenut ta' pit tal-ħamrija artifiċjali jiddevja minn metodi ta' ttestjar fuq l-organiżmi tal-ħamrija, fejn fil-biċċa l-kbira tad-drabi jintuża 10 % pit (eż. (15)). Madankollu, skont l-EPPO (16), ħamrija agrikola tipika ma għandhiex iktar minn 5 % tal-materja organika, u għalhekk it-tnaqqis fil-kontenut tal-pit jirrifletti t-tnaqqis fil-possibbiltajiet ta' ħamrija naturali għal sorbiment tas-sustanza kimika tat-test mal-karbonju organiku.

Nota 3: Jekk ikun meħtieġ, eż. għal finijiet ta' ttestjar speċifiċi, il-ħamrijiet naturali minn siti mhux imniġġsa jaf iservu wkoll bħala sottostrat tal-ittestjar u/jew tal-kultura. Madankollu, jekk tintuża ħamrija naturali, din għandha tiġi kkaratterizzata tal-inqas bl-oriġini (sit tal-ġbir), il-pH, il-konsistenza (distribuzzjoni tad-daqs tal-frak) u l-kontenut ta' materja organika. Jekk ikun disponibbli, għandu jiġi inkluż it-tip u l-isem tal-ħamrija skont il-klassifikazzjoni tal-ħamrija, u l-ħamrija ma għandu jkollha ebda kontaminazzjoni.

▼M6

F'każ li s-sustanza kimika tat-test hija metall jew metall organiku, għandha tiġi ddeterminata l-kapaċità tal-iskambju katjoniku (CEC) tal-ħamrija naturali. Għandha tingħata attenzjoni speċjali biex jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità peress li l-informazzjoni ta' sfond dwar il-ħamriji naturali ġeneralment hija rari.

11. Il-kostitwenti xotti tal-ħamrija jitħalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira). Għad-determinazzjoni tal-pH, tintuża taħlita ta' ħamrija u 1 M klorur tal-potassju (KCI) jew 0,01 M soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju ($CaCl_2$) f'proporzjon ta' 1:5 (ara (14) u Appendiċi 3). Jekk il-ħamrija hija iktar aċidika mill-medda meħtieġa (ara l-paragrafu 10), tista' tiġi aġġustata biż-żieda ta' ammont xieraq ta' $CaCO_3$. Jekk il-ħamrija hija alkalina wisq, din tista' tiġi aġġustata b'żieda ikbar tat-taħlita li tinkludi l-ewwel tliet komponenti deskritti fil-paragrafu 10, iżda li teskludi s-$CaCO_3$.

12. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) massima tal-ħamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2. Jumejn sa sebat ijiem qabel il-bidu tat-test, il-ħamrija artifiċjali xotta tixxarrab minn qabel biż-żieda ta' biżżejjed ilma distillat jew dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut ta' ilma finali, li huwa 40 sa 60 % tad-WHC massima. Il-kontenut ta' umdità huwa aġġustat għal 40-60 % tad-WHC massimu biż-żieda tas-soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test u/jew biż-żieda ta' ilma distillat jew dejonizzat (ara l-paragrafi 16-18). Verifika approssimattiva addizzjonali tal-kontenut ta' umdità fil-ħamrija għandha tinkiseb billi l-ħamrija tingħafas bil-mod fl-idejn, jekk il-kontenut ta' umdità jkun korrett, għandhom jidhru qtar żgħar tal-ilma bejn is-swaba'.

13. Il-kontenut ta' umdità fil-ħamrija huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test billi jitnixxef għal piż kostanti f'105 C skont l-ISO 11465 (17) u l-pH tal-ħamrija skont l-Appendiċi 3 jew l-ISO 10390 (14). Dawn il-kejliet għandhom jitwettqu f'kampjuni addizzjonali mingħajr dud, kemm mill-ħamrija ta' kontroll kif ukoll minn kull waħda mill-ħamriji ta' konċentrazzjoni tat-test. Il-pH tal-ħamrija ma għandux jiġi aġġustat meta s-sustanzi kimiċi aċidużi jew bażiċi huma ttestjati. Il-kontenut ta' umdità għandu jiġi ssorveljat matul it-test billi r-reċipjenti jintiżnu kull ċertu żmien (ara l-paragrafi 20 u 24).

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

14. L-ispeċi użata f'dan it-test hijia *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Biex jinbeda t-test huwa meħtieġ dud nisa adult, miksub minn koorti sinkronizzata. Id-dud għandu jiġi introdott madwar 7-14-il jum wara li jsir adult, 28 — 35 jum wara l-bidu tat-tqegħid tal-bajd fis-sinkronizzazzjoni (ara l-paragrafu 3 u l-Appendiċi 4). Is-sors tad-dud jew il-fornitur u ż-żamma tal-kultura tal-laboratorju għandhom jiġu rreġistrati. Jekk tinżamm kultura tal-laboratorju, huwa rakkomandat li l-identità tal-ispeċi tiġi kkonfermata tal-inqas darba f'sena. Skeda ta' identifikazzjoni hija inkluża bħala l-Appendiċi 6.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test

15. Is-sustanza kimika tat-test titħallat fil-ħamrija. Is-solventi organiċi użati fit-trattament tal-għajnuna tal-ħamrija bis-sustanza kimika tat-test abbażi tat-tossiċità baxxa tagħhom għad-dud u kontroll tas-solventi xieraq għandhom jiġu inklużi fid-disinn tat-test (ara l-paragrafu 29).

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

16. Tiġi ppreparata soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'ilma dejonizzat f'kwantità suffiċjenti għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni tat-test waħda. Huwa rakkomandat li tintuża kwantità xierqa ta' ilma biex jintlaħaq il-kontenut ta' umdità meħtieġ, jiġifieri 40 sa 60 % tad-WHC massima (ara l-paragrafu 12). Kull soluzzjoni ta' sustanza kimika tat-test titħawwad sew b'lott wieħed ta' ħamrija mxarrba minn qabel, qabel tiġi introdotta fir-reċipjent tat-test.

▼M6

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

17. Għal sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma iżda li jinħallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinħall fl-iżgħar volum possibbli ta' veikolu xieraq (eż. aċetun). Għandhom jintużaw biss solventi volatili. Meta jintużaw tali veikoli, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha u l-kontroll għandu jkun fihom l-istess ammont tal-veikolu. Il-veikolu jiġi sprejat fuq ammont imħalllat b'ammont żgħir, pereżempju 10 g, ta' ramel kwarzuż irqiq. Il-kontenut totali ta' ramel tas-sottostrat għandu jiġi korrett għal dan l-ammont. Il-veikolu huwa eliminat bl-evaporazzjoni taħt għata tad-dħaħen għal tal-inqas sieġħa. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied mal-ħamrija mxarrba minn qabel u titħawwad sew billi jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex tinkiseb l-umditá meħtieġa. It-taħlita finali tiġi introdotta fir-reċipjenti tat-test. Wieħed għandu jinnota li xi solventi jaf ikunu tossiċi għad-dud. Għalhekk, huwa rakkomandat li jintuża kontroll tal-ilma addizzjonali mingħajr veikolu jekk it-tossiċità tas-solvent għad-dud ma tkunx magħrufa. Jekk jintwera b'mod adegwat li s-solvent (fil-konċentrazzjonijiet li għandhom jiġu applikati) ma għandu ebda effett, il-kontroll tal-ilma jista' jiġi esklużż.

Sustanza kimika tat-test li ma tantx tinħall fl-ilma u solventi organiċi

18. Għal sustanzi kimiċi li ma tantx jinħallu fl-ilma u solventi organiċi, l-ekwivalent ta' 2,5 g ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq f'kull reċipjent tat-test (pereżempju 10 g ta' ramel kwarzuż irqiq għal erba' repliki) jitħallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni tat-test xierqa. Il-kontenut totali ta' ramel tas-sottostrat għandu jiġi korrett għal dan l-ammont. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' ħamrija mxarrba minn qabel u titħallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut ta' umditá meħtieġ. It-taħlita finali tinqasam bejn ir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jiġi ppreparat ukoll kontroll xieraq.

PROĊEDURA

Gruppi tat-test u kontrolli

19. Huma rakkomandati għaxar nisa adulti f'massa xotta ta' 20 g ta' ħamrija artifiċjali għal kull reċipjent ta' kontroll u ta' trattament. L-organiżmi tat-test għandhom jiżdiedu fi żmien sagħtejn wara l-preparazzjoni tas-sottostrat finali tat-test (jiġifieri wara l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test). F'każijiet speċifiċi (eż. meta t-tixjiħ huwa kkunsidrat bħala fattur determinanti) il-ħin bejn il-preparazzjoni tas-sottostat tal-ittestjar finali u ż-żieda tad-dud jista' jittawwal (għal dettalji ta' tali tixjiħ, ara (18)). Madankollu, f'tali każijiet għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika.

20. Wara ż-żieda tad-dud tal-ittestjar mal-ħamrija, id-dud jiġi pprovdut bl-ikel u l-piż inizjali ta' kull reċipjent tat-test għandu jitkejjel biex jintuża bħala referenza għall-monitoraġġ tal-kontenut ta' umditá tal-ħamrija matul it-test kif deskritt fil-paragrafu 24. Ir-reċipjenti tat-test imbagħad jitgħattew kif deskritt fil-paragrafu 8 u jitqiegħdu fil-kompartiment tat-test.

21. Jiġu ppreparati kontrolli xierqa għal kull wieħed mill-metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test deskritti fil-paragrafi 15 sa 18. Il-proċeduri rilevanti deskritti huma segwiti għall-preparazzjoni tal-kontrolli ħlief li s-sustanza kimika tat-test ma tiżdiedx. Għalhekk, fejn ikun xieraq, is-solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż jew veikoli oħra jiġu applikati mal-kontrolli f'konċentrazzjonijiet/ammonti bħal fit-trattamenti. Fejn jintuża solvent jew veikolu ieħor biex tiżdied is-sustanza kimika tat-test, għandu jiġi ppreparat u ttestjat ukoll kontroll addizzjonali mingħajr il-veikolu jew is-sustanza kimika tat-test f'każ li t-tossiċità tas-solvent ma tkunx magħrufa (ara l-paragrafu 17).

▼M6

Kundizzjonijiet tat-test

22. It-temperatura tat-test għandha tkun ta' 20 ± 2 °C. It-temperatura għandha tiġi rreġistrata tal-inqas kuljum u jekk ikun meħtieġ tiġi aġġustata. It-test jitwettaq f'ċikli ta' dawl u dlam ikkontrollati (preferibbilment 16-il siegħa dawl u 8 sigħat dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux qrib ir-reċipjenti tat-test. Għal raġunijiet ta' tqabbil, dawn il-kundizzjonijiet huma l-istess bħal f'testijiet ekotossikoloġiċi tal-ħamrija oħrajn (eż. (15)).

23. L-iskambju gassuż għandu jiġi ggarantit bl-arjazzjoni tar-reċipjenti tat-test tal-inqas darbtejn f'ġimgħa f'każ li jintużaw għotjien li jingħalqu bil-kamin. Jekk jintużaw għotjien b'garża, għandha tingħata attenzjoni speċjali għażżamma tal-kontenut ta' umdità tal-ħamrija (ara l-paragrafi 8 u 24).

24. Il-kontenut tal-ilma tas-sottostrat tal-ħamrija fir-reċipjenti tat-test jinżamm matul it-test kollu billi jintiżen u jekk ikun meħtieġ kull ċertu żmien ir-reċipjenti tat-test jerġgħu jissaqqu (eż. darba f'ġimgħa). It-telf huwa rifornit kif meħtieġ b'ilma dejonizzat. Il-kontenut ta' umdità matul it-test ma għandux ikun differenti b'iktar minn 10 % mill-valur tal-bidu.

Tagħlif

25. Id-dud tal-ġobon (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) intwera li huwa sors ta' ikel xieraq. Kollemboli żgħar (eż. *Folsomia candida* Willem żgħar, 1902 jew Onychiurus *fimatus* (19), (20), enkitraeidi (eż. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) jew nematodi (eż. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) jistgħu jkunu xierqa wkoll (21). Huwa rakkomandat li l-ikel jiġi vverifikat qabel jintuża f'test. It-tip u l-ammont ta' ikel għandu jiggarantixxi numru adegwat ta' frieħ sabiex jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità (paragrafu 6). Għall-għażla tal-priża, għandu jiġi kkunsidrat il-mod ta' azzjoni tal-oġġett tat-test (eż. akariċida tista' tkun tossika għad-dud tal-ikel ukoll, ara l-paragrafu 26).

26. Għandu jiġi pprovdut ikel *ad libitum (*jiġifieri kull darba ammont żgħir (ponta ta' spatula)). Għal dan il-għan, jista' jintuża wkoll exhaustor b'ġibda baxxa kif propost fit-test tal-kollemboli jew pinzell irqiq. Il-forniment ta' ikel fil-bidu tat-test u darbtejn sa tliet darbiet fil-ġimgħa ġeneralment sejjer ikun suffiċjenti. Meta l-oġġett tal-ittestjar jidher li huwa tossiku għall-priża, għandha tiġi kkunsidrata żieda fir-rata ta' tagħlif mu/jew sors ta' ikel alternattiv.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

27. L-għarfien minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għandu jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa, eż. minn studji tas-sejba tal-medda. Meta jkun meħtieġ, jitwettaq test tas-sejba tal-medda b'ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fil-medda ta' 0,1 — 1 000 mg/kg ta' ħamrija xotta, b'tal-inqas replikat wieħed għat-trattamenti u l-kontroll. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda huwa ta' 14-il jum, fejn wara tiġi ddeterminata l-mortalità tad-dud adult u n-numru ta' frieħ. Idealment, il-medda ta' konċentrazzjoni fit-test finali għandha tintgħażel b'tali mod li tinkludi konċentrazzjonijiet li fihom huma affettwati n-numru ta' frieħ filwaqt li l-ġenerazzjoni tal-ommijiet le. Madankollu, dan jaf ma jkunx possibbli għal sustanzi kimiċi li jikkawżaw effetti letali jew kważi letali f'konċentrazzjonijiet kważi simili. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza kimika għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom ikunu "bracketed" bil-konċentrazzjonijiet inklużi fit-test. Estrapolazzjoni ferm iktar baxxa mill-konċentrazzjoni l-iktar baxxa li taffettwa l-organiżmi tat-test jew ikbar mill-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha ssir biss f'każijiet eċċezzjonali, u għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa fir-rapport.

Disinn sperimentali

Testijiet ta' rispons għad-doża

28. Huma proposti tliet disinji tat-test, abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test ieħor (Test tar-riproduzzjoni tal-enkitraeidi

▼M6

(22)). L-adegwatezza ġenerali ta' dawn id-disinji kollha kienet ikkonfermata mill-eżitu tal-validazzjoni ta' *H. aculeifer*.

29. Fl-istabbiliment tal-medda ta' konċentrazzjonijiet, wieħed għandu jżomm f'moħħu dan li ġej:

— Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}), għandhom jiġu ttestjati tnax-il konċentrazzjoni. Huma rakkomandati tal-inqas żewġ repliki għal kull konċentrazzjoni u sitt repliki ta' kontroll. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugwali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet.

— Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 2,0.

— Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal-EC_x. Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 1,8.

Test tal-limitu

30. Jekk ma jiġu osservati ebda effetti fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg ta' piż xott tal-ħamrija), it-test tar-riproduzzjoni finali jitwettaq bħala test tal-limitu, permezz ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg ta' piż xott tal-ħamrija. Test tal-limitu sejjer jipprovdi l-opportunità biex juri li l-NOEC jew l-EC_{10} għar-riproduzzjoni hija ikbar mill-konċentrazzjoni tal-limitu filwaqt li jitnaqqas in-numru ta' dud użat fit-test. Għandhom jintużaw tmien repliki kemm għall-ħamrija ttrattata kif ukoll il-kontroll.

Durata u kejliet tat-test

31. Għandha tiġi rreġistrata kwalunkwe differenza osservata fl-imġiba u l-morfoloġija tad-dud fil-kontroll u r-reċipjenti ttrattati.

32. Fl-14-il jum id-dud li baqa' ħaj jiġi estratt mill-ħamrija permezz ta' estrazzjoni bis-sħana/dawl jew b'metodu xieraq ieħor (ara l-Appendiċi 5). In-numru ta' frieħ (jiġifieri larvi, protonimfi u dewtonimfi) u adulti jingħaddu separatament. Kwalunkwe dudu rqiq li ma jinstabx f'dan il-ħin għandu jiġi rreġistrat bħala mejjet, peress li wieħed jassumi li tali dud miet u ddekompona qabel il-valutazzjoni. L-effiċjenza tal-estrazzjoni għandha tkun ivvalidata darba jew darbtejn f'sena fil-kontrolli b'numru magħruf ta' adulti u frieħ. L-effiċjenza għandha tkun iktar minn 90 % bħala medja kkombinata għall-istadji tal-iżvilupp kollha (ara l-Appendiċi 5). L-għadd ta' adulti u frieħ mhumiex aġġustati għall-effiċjenza.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

33. Informazzjoni dwar il-metodi statistiċi li jistgħu jintużaw għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar tingħata fil-paragrafi 36 sa 41. Barra minn hekk, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument 54 tal-OECD dwar l-"Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni" (31).

34. Il-punt ta' tmiem ewlieni tat-test hija l-produzzjoni riproduttiva, hawnhekk in-numru ta' frieħ prodotti f'kull reċipjent tat-test tar-replikat (b'10 nisa adulti introdotti). L-analiżi statistika teħtieġ il-medja aritmetika (X) u l-

▼M6

varjanza
(s^2) għall-produzzjoni riproduttiva li għandha tiġi kkalkolata għal kull trattament u għal kull kontroll. X u s^2 jintużaw għall-proċeduri ANOVA bħat-test t tal-Istudent, it-test ta' Dunnett, jew it-test ta' Williams kif ukoll għall-kalkolu ta' intervalli ta' kunfidenza ta' 95 %.

Nota: Dan il-punt ta' tmiem ewlieni huwa ekwivalenti għall-fekondità mkejla bħala n-numru ta' frieħ ħajjin prodotti matul it-test diviż min-numru ta' nisa parentali introdotti fil-bidu tat-test.

35. In-numru ta' nisa li baqgħu ħajjin fil-kontrolli mhux ittrattati huwa kriterju ta' validità ewlieni u għandu jiġi ddokumentat. Bħal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' ħsara l-oħra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll.

EC_x

36. Il-valuri EC_x inkluż il-limiti ta' kunfidenza baxxi u superjuri assoċjati tagħhom ta' 95 % għall-parametru deskritt fil-paragrafu 34 huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni loġistika jew Weibull, metodu Spearman-Karber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi). EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC_{50} jew kwalunkwe EC_x, il-medji għal kull trattament (x) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-rigressjoni.

NOEC/LOEC

37. Jekk analiżi statistika hija maħsuba biex tistabbilixxi l-NOEC/LOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa (skont id-Dokument tal-OECD 54 dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta Ekotossika: Gwida għall-Applikazzjoni). B'mod ġenerali, l-effetti avversi tal-oġġett tal-ittestjar meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (iżgħar) bi tmiem wieħed f'$p \leq 0,05$. Eżempji jingħataw fil-paragrafi li ġejjin.

38. Id-distribuzzjoni normali tad-dejta tista' tiġi ttestjata eż. bit-test tat-tjubija tal-adattament ta' Kolmogorov-Smirnov, it-Test tal-proporzjon tad-devjazzjoni tal-medda mill-istandard (R/s-test) jew it-test Shapiro-Wilk (żewġ naħat, $p \leq 0,05$). Biex tiġi ttestjata l-varjanza tal-omoġenità jistgħu jintużaw it-test ta' Cochran, it-test ta' Levene jew it-test ta' Bartlett, (b'żewġ naħat, ($p \leq 0,05$). Jekk il-prerekwiżiti tal-proċeduri tal-ittestjar parametriku (in-normalità, l-omoġenità tal-varjanza) jiġu ssodisfati, tista' titwettaq Analiżi tal-Varjanza (ANOVA) b'Direzzjoni waħda u testijiet ta' tqabbil b'diversi paraguni sussegwenti. Paraguni multipli (eż. test-t ta' Dunnett) jew testijiet ta' tendenza rigressiva (eż. test ta' Williams fil-każ ta' relazzjoni monotona bejn bejn id-doża u r-rispons) jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi sinifikanti ($p \leq 0,05$) bejn il-kontrolli u d-diversi konċentrazzjonijiet tal-oġġetti tal-ittestjar (l-għażla tat-test rakkomandat skont id-Dokument tal-OECD 54 dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni). Inkella, għandhom jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. it-test-U ta' Bonferroni skont it-test ta' tendenza ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) biex jiġu ddeterminati l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

39. Jekk jitwettaq test tal-limitu (tqabbil tal-kontroll u trattament wieħed biss) u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametriku (in-normalità, l-omoġenità), ir-risponsi metriċi jistgħu jiġu evalwati mit-Test ta' Student (test-t). Jista' jintuża t-test-t tal-varjanza mhux ugwali (test-t ta' Welch) jew test mhux parametriku, bħat-test-U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati.

40. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi

▼M6

sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Rapport tat-test

41. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas l-informazzjoni li ġejja:

— *Sustanza kimika tat-test*

— l-identità tas-sustanza kimika tat-test, l-isem, il-lott, in-numru tal-lott u CAS, il-purità;

— il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log K_{ow}, is-solubilità fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-kostanti ta' Henry (H) u idealment informazzjoni fuq l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija).

— *Organiżmi tat-test*

— identifikazzjoni u fornitur tal-organiżmi tal-ittestjar, deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-kulturi;

— medda ta' etajiet tal-organiżmi tal-ittestjar.

— *Kundizzjonijiet tat-test*

— deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura sperimentali;

— dettalji tal-preparazzjoni għall-ħamrija tal-ittestjar; speċifikazzjoni ddettaljata jekk tintuża ħamrija naturali (oriġini, storja, distribuzzjoni tad-daqs tal-frak, pH, kontenut tal-materja organika u jekk tkun disponibbli l-klassifikazzjoni tal-ħamrija)

— il-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija;

— deskrizzjoni tat-teknika użata biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test lill-ħamrija;

— dettalji tas-sustanzi kimiċi awżiljari użati għall-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— id-daqs tar-reċipjenti tat-test u l-massa xotta tal-ħamrija tat-test għal kull reċipjent;

— kundizzjonijiet tat-test: intensità tad-dawl, durata taċ-ċikli tad-dawl u d-dlam, it-temperatura;

— deskizzjoni tar-reġim ta' tagħlif, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati ta' tagħlif;

— il-pH u l-kontenut tal-ilma tal-ħamrija fil-bidu u matul it-test (kontroll u kull trattament)

— deskrizzjoni ddettaljata tal-metodu ta' estrazzjoni l-effiċjenza tal-estrazzjoni.

— *Riżultati tat-test*

— in-numru ta' frieħ iddeterminat f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;

— in-numru ta' nisa adulti u l-mortalità tal-adulti (%) f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test

— deskrizzjoni tas-sintomi ovvji jew bidliet distinti fl-imġiba;

— ir-riżultati miksuba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;

— statistika fil-qosor (EC_x u/jew NOEC) inkluż limiti ta' kunfidenza ta' 95 % u deskrizzjoni tal-metodu tal-kalkolu;

▼**M6**

— plott tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons;

— devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS — Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition. Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: p 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

(8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

(14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼**M6**

(15) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness -. Toxicity for Earthworms..

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Il-Kapitolu C.32 ta' dan l-Anness- Test tar-riproduzzjoni tal-enkitraeidi.

(23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with “good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/-MONO(2006)18

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar (f'dan it-test il-konċentrazzjonijiet tal-effetti kollha huma espressi bħala massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test):

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita

NOEC (konċentrazzjoni bla effett osservat) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

LOEC (il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

EC_x (konċentrazzjoni tal-effett għal effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża effett ta' x % fuq l-organiżmi tat-test f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

Sustanza Kimika tat-Test hija sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼**M6**

Appendiċi 2

Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima tal-ilma tal-ħamrija huwa kkunsidrat bħala xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (Kwalità tal-Ħamrija — Effetti tas-sustanzi li jniġġsu fuq il-ħniex (*Eisenia fetida*). Parti 2: Determinazzjoni tal-effetti fuq ir-riproduzzjoni (23)).

Iġbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-ħamrija tal-ittestjar permezz ta' apparat ta' kampjunar xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru mimlija bl-ilma u mbagħad qiegħda fuq xtelliera f'banjumarija. It-tubu għandu jiddaħħal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-ħamrija. Imbagħad għandu jitħalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-ħamrija jista' jinżamm, il-kampjun tal-ħamrija għandu jitħalla jitbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpoġġi t-tubu fuq saff ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq, imxarrab ħafna ġewwa reċipjent mgħotti (biex jiġi evitat li jinxef). Il-kampjun għandu mbagħad jintiżen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f′ \% ta′ massa xotta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

▼**M6**

Appendiċi 3

Determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO DIS 10390: Kwalità tal-Ħamrija — Determinazzjoni tal-pH (16).

Kwantità ddefinita ta' ħamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-ħamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' ħamrija) f'ħames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku ($CaCl_2$). Is-sospensjoni mbagħad titħallat sew għal ħames minuti u mbagħad titħalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Il-pH tal-fażi likwida mbagħad jitkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

▼M6

Appendiċi 4

Trobbija ta' *(Geolaelaps) aculeifer*, dud tal-ikel u sinkronizzazzjoni tal-kultura

Trobbija ta' Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer:

Il-kulturi jistgħu jinżammu f'reċipjenti tal-plastik jew vażetti tal-ħġieġ mimlija b'taħlita (9:1) ta' plaster bil-ġibs ta' Paris / trab tal-faħam. Il-ġibs jista' jinżamm umdu billi jiżdiedu ftit qtar ta' ilma distillat jew dejonizzat jekk ikun meħtieġ. It-temperaturi tat-trobbija huma ottimali bejn 20 ± 2 °C, reġim fid-dawl / dlam mhuwiex rilevanti għal din l-ispeċi. Il-priża tista' tkun dud Typrophagus putrescentiae jew Caloglyphus sp.(id-dud tal-ikel għandu jiġi mmaniġġjat b'attenzjoni peress li jista' jikkawża allerġiji fil-bnedmin), iżda nematodi, enkitraeidi u kollembolani huma adattati wkoll bħala priża. Is-sors tagħhom għandu jiġi rreġistrat. L-iżvilupp tal-popolazzjoni jista' jibda b'mara waħda peress li l-irġiel jiżviluppaw f'bajd mhux fertilizzat. Il-ġenerazzjonijiet jikkoinċidu ħafna. Mara tista' tgħix tal-inqas 100 jum u tista' tbid madwar 100 bajda matul il-ħajja tagħha. Rata ta' bidien massima tintlaħaq bejn l-10 u l-40 jum (wara li jsiru adulti) u tammonta għal 2,2 nisa tal-bajd^{-1} jum^{-1}. Iż-żmien ta' żvilupp minn bajda għal mara adulta huwa madwar 20 jum f'20 °C. Iktar minn kultura waħda għandha tiġi tinżamm minn qabel.

Trobbija ta' Typrophagus putrescentiae:

Id-dud jinżamm f'reċipjent tal-ħġieġ mimli bi trab irqiq tal-ħmira tal-birreriji li jitqiegħed f'barmil tal-plastik mimli b'soluzzjoni KNO_3 sabiex jiġi evitat li jaħrab. Id-dud tal-ikel jitqiegħed fuq wiċċ dan it-trab. Wara, jitħallat b'attenzjoni mat-trab (li għandu jitbiddel darbtejn fil-ġimgħa) permezz ta' spatula.

Sinkronizzazzjoni tal-kultura:

Il-kampjuni li jintużaw fit-test għandhom ikunu tal-istess età (ca. 7 ijiem wara l-ilħuq tal-istadju adult). F'temperatura ta' trobbija ta' 20 °C, din tintlaħaq billi

Ittasferixxi n-nisa lejn reċipjent tat-trobbija u żid biżżejjed ikel

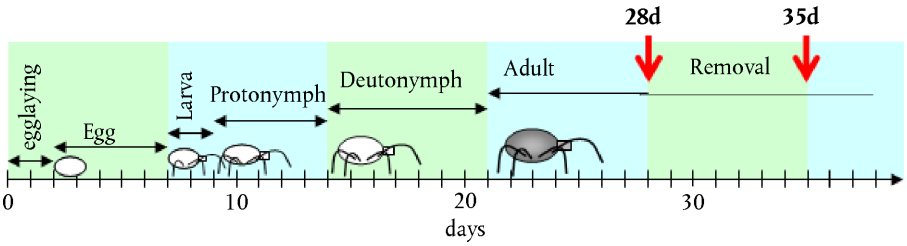
— Ħalli jumejn sa tliet ijiem għall-bidien tal-bajd, neħħi n-nisa

— Ħu n-nisa adulti għall-ittestjar bejn it-28 u l-35 jum wara li tibda tqiegħed l-adulti nisa f'reċipjenti ta' trobbija nodfa.

In-nisa adulti jistgħu jintgħarfu faċilment mill-irġiel u stadji ta' żvilupp oħra mid-daqs ikbar, il-forma minfuħa u t-tarka dorsali kannella tagħhom (l-irġiel huma irqaq u ċatti), in-nisa immaturi jkunu bojod għal kulur il-krema. L-iżvilupp tad-dud isegwi bejn wieħed u ieħor il-mudell deskritt hawn taħt f'20 °C (figura): Bajda 5 ijiem, Larva jumejn, Protonimfa 5 ijiem, Dewtonimfa 7 ijiem, perjodu ta' qabel il-bidien tal-mara jumejn. Wara, id-dud isir adult.

Figura

Żvilupp ta' Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer f'20 °C. (tneħħija = nisa użati għat-test)



▼**M6**

L-annimali tal-ittestjar adulti jitneħħew mill-kultura sinkronizzata u introdotti fir-reċipjenti tat-test bejn it-28 u l-35 jum wara li l-nisa ġenituri jkunu bdew ibidu l-bajd (jiġifieri 7 — 14-il jum wara li saru adulti). Dan jiżgura li l-annimali tal-ittestjar diġà jkunu għaddew mill-perjodu ta' preovipożizzjoni u tgħammru ma' rġiel li diġà jinsabu fir-reċipjent tal-kultura. Osservazzjonijiet fil-kulturi tal-laboratorju jissuġġerixxu li n-nisa jitgħammru eżatt jew ftit wara li jsiru adulti jekk ikun hemm l-irġiel (Ruf, Vaninnen, pers. obs.). Il-perjodu ta' sebat ijiem jintgħażel biex jiffaċilita l-integrazzjoni fir-rutina tal-laboratorju u biex joffri protezzjoni kontra l-varjabbiltà tal-iżvilupp individwali fost id-dud. Il-bidien għandu jinbeda b'tal-inqas l-istess numru ta' nisa li huma eventwalment meħtieġa għat-test (Jekk pereżempju jkunu meħtieġa 400 mara fit-test, tal-inqas 400 mara għandhom jitħallew ibidu l-bajd għal minn jumejn sa tlett ijiem. Tal-inqas 1 200 bajda għandhom ikunu l-punt ta' bidu għall-popolazzjoni sinkronizzata (proporzjon tas-sess madwar 0,5, mortalità madwar 0,2). Biex jiġi evitat il-kannibaliżmu, huwa iktar fattibbli li ma jinżammux iktar minn 20-30 mara li jbidu l-bajd f'reċipjent wieħed.

▼**M6**

Appendiċi 5

Metodi ta' estrazzjoni

Għal mikroartropodi, estrazzjoni bis-sħana hija metodu xieraq għal kampjuni separati mill-ħamrija / sottostrat (ara l-figura ta' hawn taħt). Il-metodu huwa bbażat fuq l-attività tal-organiżmi, b'hekk il-kampjuni mobbli biss sejjer ikollhom il-possibbiltà li jiġu rreġistrati. Il-prinċipju tal-estrazzjoni bis-sħana huwa li jagħmel l-kundizzjonijiet għall-organiżmi gradwalment agħar fil-kampjun, biex b'hekk jitilqu mis-sottostrat u jaqgħu f'likwidu ta' ffissar (eż. etanol). Il-punti kruċjali huma d-durata tal-estrazzjoni u l-gradjent ta' kundizzjonijiet tajbin sa moderati sa ħżiena għall-organiżmi. Id-durata tal-estrazzjoni għat-testijiet ekotossikoloġiċi għandha tkun kemm jista' jkun qasira, peress li kwalunkwe tkabbir fil-popolazzjoni matul il-ħin tal-estrazzjoni jiffalsifika r-riżultati. Min-naħa l-oħra, it-temperatura u l-kundizzjonijiet ta' umdità fil-kampjun għandhom dejjem ikunu f'medda li tħalli lid-dud jiċċaqlaq. It-tisħin ta' kampjun tal-ħamrija jwassal għat-tnixxif ta' sottostrat. Jekk it-tnixxif ikun rapidu wisq, xi dud jaf ukoll jinxef qabel ikun irnexxilu jaħrab.

Għalhekk, hija proposta l-proċedura li ġejja (24) (25):

Apparat: Lembut Tullgren jew metodi paragunabbli bħal eż. McFadyen (tisħin minn fuq, il-kampjun jitpoġġa fuq lembut)

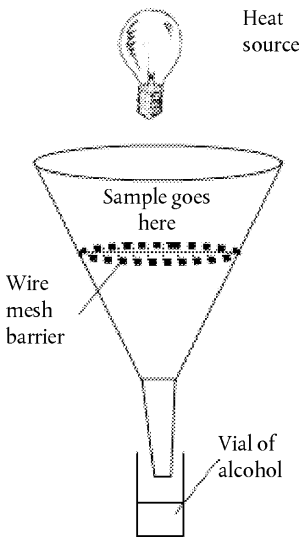
Reġim ta' tisħin: 25 °C għal 12-il siegħa, 35 °C għal 12-il siegħa, 45 °C għal 24 siegħa (total ta' 48 siegħa). It-temperatura għandha titkejjel fis-sottostrat.

Likwidu ta' ffissar: 70 % etanol

Dettalji: Ħu l-kunjett tal-ħġieġ li ntuża għat-test. Neħħi l-għatu u dawwar biċċa xibka jew drapp madwar il-ftuħ. It-tessut għandu jkollu daqs tax-xibka ta' 1,00 sa 1,5 mm. Waħħal id-drapp b'lasktuwa. Bil-mod dawwar il-kunjett rasu 'l isfel u qiegħdu fl-apparat tal-estrazzjoni. It-tessut iwaqqaf is-sottostrat milli joqgħod iqattar fil-likwidu ta' ffissar iżda jippermetti lid-dud jitlaq mill-kampjun. Ibda r-reġim ta' tisħin wara li tkun daħħalt il-kunjetti kollha. Temm l-estrazzjoni wara 48 siegħa. Neħħi l-kunjetti ta' ffissar u għodd id-dud permezz ta' mikroskopju tat-tnixxif.

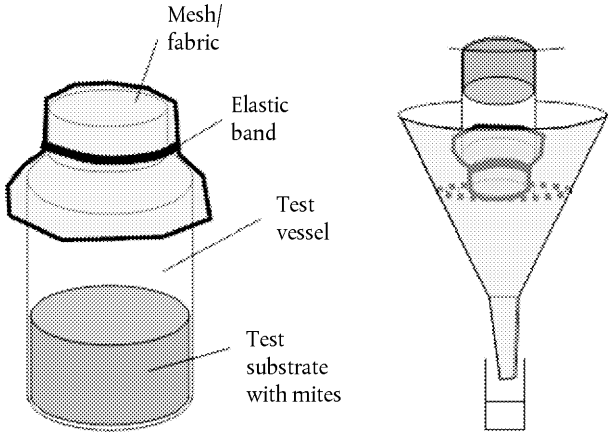
L-effiċjenza fl-estrazzjoni tal-metodu magħżul għandha tkun ġiet ipprova darba jew darbtejn fis-sena permezz tar-reċipjenti li jkun fihom numru magħruf ta' frieħ u dud adult miżmuma f'sottostrat tat-test mhux ittrattat. L-effiċjenza għandha tkun ≥ 90 % mill-medja kkombinata għall-istadji tal-iżvilupp kollha.

Apparat ta' estrazzjoni tat-tip Tullgren



▼**M6**

Kif tipprepara l-kunjett tat-test wara li jintemm it-test, qabel l-estrazzjoni



▼**M6**

Appendiċi 6

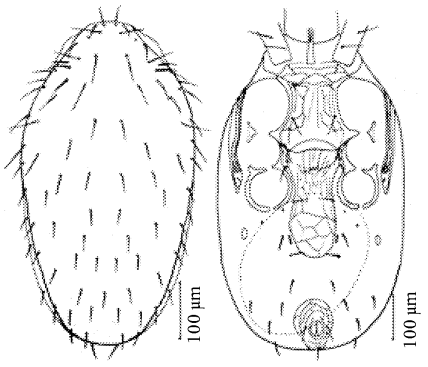
Identifikazzjoni ta' Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Sottoklassi/ordni/sotto-ordni:	Familja:	Ġene/sottoġene/speċji:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

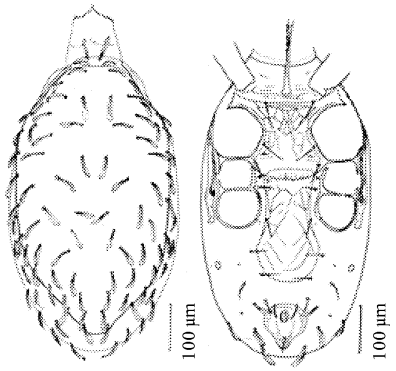
Awtur u Data:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 January 2007

Letteratura użata:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

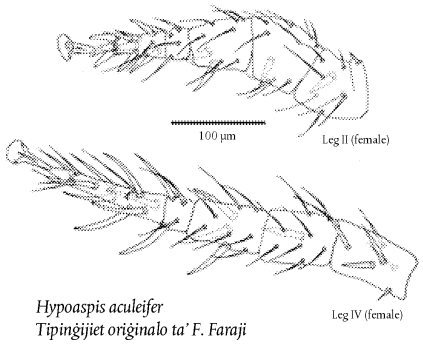
Karatteristiċi deterministiċi:	Tektum b'tarf tas-snin tond; skanalaturi ipostomali b'iktar minn 6 snin żgħar; setae dorsali tad-denb ta' Z4 mhux twil ħafna; setae setiform dorsali; kisi ġenitali normali, mhux imkabbar ħafna u li ma jilħaqx il-kisja anali; nofs ta' wara tal-kisja dorsali mingħajr setae mhux abbinati; saqajn II u IV b'xi macrosetae ħoxnin; seta dorsali Z5 madwar darbtejn itwal minn J5; numru fiss ta' chelicera bi 12-14-il sinna u numru mobbli b'2 sinniet; Idiosoma b'tul ta' 520-685 µm. Hypoaspis miles jintuża wkoll fil-kontroll bijoloġiku u jista' jitħawwad ma' H. aculeifer. Id-differenza ewlenija hija: H. miles jagħmel parti mis-sottoġeneru Cosmolaelaps u għandu setae dorsali qisu sikkina filwaqt li H. aculeifer jagħmel parti mis-sottoġeneru Geolaelaps u għandu setae dorsali setiform.



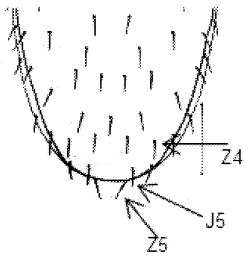
Hypoaspis aculeifer Wara Hughes, 1976



Hypoaspis miles Wara Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Tipiniġijiet oriġinalo ta' F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
tarka dorsali b'setas karatteristiċi

▼**M6**

Appendiċi 7

Informazzjoni bażika dwar il-bijoloġija ta' *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer jagħmel parti mill-familja Lealapidae, ordni Acari (dud), klassi Arachnida, tribù Arthropoda. Dawn jgħixu f'kull tip ta' ħamrija u jieklu dud ieħor, nematodi, enkitraeidi u kollembolani (26). F'każ ta' nuqqas ta' ikel, dawn jeqilbu għall-kannibaliżmu (27). Id-dud predatorju jitqassam f'segmenti f'idiosoma u gnatosoma. Distinzjoni ċara bejn idjosoma fil-prosoma (ras) u opistosoma (addome) ma teżistix. Il-gnatosoma (kisja tar-ras) fiha l-istrumenti għat-tagħlif bħal palps u chelicera. Il-chelicers jitqassmu fi tliet partijiet u jkollhom snin twal bil-ponta b'għamliet differenti. Minbarra l-inġestjoni, l-irġiel jużaw il-chelicers tagħhom prinċipalment biex jittrasferixxu l-ispermatofori lin-nisa. Kisja dorsali tkopri kważi kompletament l-idjosoma. Parti kbira mill-idiosoma tal-mara hija okkupata mill-organi riproduttivi, li huma b'mod partikolari evidenti ftit qabel ma jbidu l-bajd. Fuq iż-żaqq, jistgħu jinstabu żewġ kisjiet, il-kisja sternali u dik ġenitali. Is-saqajn kollha jiġu pprovduti b'lanżit u xewk. Il-lanżit jintuża biex ikunu jistgħu jeħlu meta jimxu fuq wiċċ il-ħamrija jew ġo fiha. L-ewwel par saqajn jużawhom prinċipalment bħala antenni. It-tieni par saqajn ma jużawhomx biss biex jiċċaqalqu iżda anki biex jifggħu l-priża. Ix-xewk tar-raba' par jista' jservi bħala protezzjoni kif ukoll "mutur għaċ-ċaqliq" (28). L-irġiel huma twal 0,55 — 0,65 mm u jiżnu 10 — 15 µg. In-nisa huma twal 0,8 — 0,9 mm u jiżnu 50 — 60 µg (8) (28) (Fig 1).

Fig. 1

In-nisa, l-irġiel, il-protonimfa u l-larvi ta' H. aculeifer.



F'23 °C, id-dud isir sesswalment matur wara 16-il jum (nisa) u 18-il jum (irġiel), rispettivament (6). In-nisa jġorru l-isperma fis-solenostom fejn imbagħad sejrin jiġu ttrasferiti lejn l-ovar. Fl-ovar l-isperma timmatura u sejrin jinħażnu. Il-fertilizzazzjoni ssir biss wara l-maturazzjoni tal-isperma fl-ovar. In-nisa sejrin ibidu l-bajd fertilizzat jew mhux fertilizzat f'ċapep jew b'mod separat, preferibbilment fi xquq jew toqob. In-nisa li għaddew minn kopulazzjoni jistgħu jġorru frieħ taż-żewġ sessi, filwaqt li minn bajd tan-nisa li ma għaddewx minn kopulazzjoni sejrin ifaqqsu frieħ irġiel biss. Biex isiru adulti, dawn iridu jgħaddu minn erba' fażijiet (bajda — larva, larva — protonimfa, protonimfa — dewtonimfa, dewtonimfa — adult).

Il-bajda tkun ta' kulur abjad bħall-ħalib, ijalina, ellissa u b'tul ta' madwar 0,37 mm b'mantell solidu. Skont (8), il-larvi għandhom daqs ta' bejn 0,42 — 0,45 mm. Dawn għandhom biss tliet pari saqajn. Fil-parti tar-ras, jiżviluppaw chelicers u palps. Il-chelicers, li jkollhom xi ftit snin zgħar (denticles), jintużaw biex ikunu jistgħu joħorġu mill-bajda. Wara l-ewwel tqaxxir, bejn jum u jumejn wara t-tfaqqis, jiġu żviluppati l-protonymphs. Dawn huma bojod ukoll, b'daqs ta' 0,45

▼**M6**

— 0,62 mm (8) u għandhom erba' pari saqajn. Fuq il-chelicers, is-snin ikunu jidhru kompletament. Meta jingħata bidu għal dan l-istadju, id-dud jibda jagħlef. Għal din ir-raġuni l-kutikula tal-priża tittaqqab bil-chelicers u tiddaħħal sekrezzjoni għal diġestjoni intestinali żejda fil-priża. Il-maxx tal-ikel tista' mbagħad tiġi mirdugħa mid-dudu. Il-chelicers jistgħu jintużaw ukoll biex jitqatgħu frak ikbar minn biċċiet tal-ikel (28). Wara tqaxxir ieħor, jiġu żviluppati d-dewtonimfi. Dawn ikollhom daqs ta' 0,60 — 0,80 mm (8) u b'kulur isfar għal kannella ċar. Meta jingħata bidu għal din il-fażi, dawn jistgħu jiġu separati f'nisa u rġiel. Wara tqaxxir ieħor, li matulu l-annimali huma inattivi u tkun qiegħda tiżviluppa l-kisja kannella (wara madwar 14-il jum), id-dud isir adult (28) (29) (30). It-tul ta' ħajja tagħhom huwa bejn 48 u 100 jum f25 °C (27).

▼**M6**

Appendiċi 8

Sommarju u skeda taż-żmien tal-azzjonijiet ewlenin li għandhom jittieħdu sabiex jitwettaq it-test ta' Hypoaspis

Żmien (jiem) bidu tat-test = jum 0	Attività / kompitu
Jum – 35 sa – 28	Ittrasferixxi n-nisa mill-kultura ewlenija lejn reċipjenti nodfa biex tibda s-sinkronizzazzjoni jumejn wara: neħħi n-nisa darbtejn jew tliet darbiet fil-ġimgħa: fornihom b'biżżejjed ikel
Jum – 5 (+/– 2)	Ipprepara l-ħamrija artifiċjali
Jum – 4 (+/– 2)	Iddetermina d-WHC tal-ħamrija artifiċjali Nixxef mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kampjuni u kkalkola d-WHC
Jum – 4 (+/– 2)	Xarrab minn qabel il-ħamrija artifiċjali biex tilħaq 20 — 30 % ta' WHC
Jum 0	Ibda t-test: żid is-sustanza kimika tat-test mal-ħamrija artifiċjali Introduċi 10 nisa f'kull replikat Iżen kull replikat Stabbilixxi kontrolli abjotiċi għall-kontenut ta' umdità u l-pH, 2 repliki għal kull trattament Nixxef il-kontrolli tal-umdità mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kontrolli tal-umdità Il-jum li jmiss: kejjel il-pH tal-kontrolli abjotiċi mnixxfa
Jum 3, 6, 9, 12 (madwar)	Forni kull replikat b'ammont suffiċjenti ta' organiżmi tal-priża Iżen kull replikat u eventalment żid ilma evaporat
Jum 14	Spiċċa t-test, stabbilixxi l-estrazzjoni bir-repliki kollha flimkien mal-kontrolli tal-effiċjenza tal-estrazzjoni Nixxef il-kontrolli ta' kontenut ta' umdità mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kontrolli ta' kontenut ta' umdità Il-jum li jmiss: kejjel il-pH tal-kontrolli abjotiċi mnixxfa
Jum 16	Ittermina l-estrazzjoni
Jum 16 +	Irreġistra n-numru ta' adulti u frieħ fil-materjal estratt Irrapporta r-riżultati fuq it-tabelli ta' mudell Irrapporta l-proċedura tal-ittestjar fl-iskedi tal-protokoll tat-test.

▼M6

C.37. ASSAĠĠ FUQ 21 JUM TAL-ĦUT: SKRINJAR FUQ PERJODU QASIR GĦAL ATTIVITÀ ESTROĠENIKA U ANDROĠENIKA, U INIBIZZJONI TAL-AROMATAŻI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 230 tal-OECD (2009). Il-ħtieġa li jiġi żviluppat u vvalidat assaġġ tal-ħut li jkun jista' jidentifika ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali ġejja mit-tħassib li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkawżaw effetti avversi kemm fil-bnedmin kif ukoll fl-organiżmi slavaġ minħabba l-interazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi mas-sistema endokrinali. Fl-1998, l-OECD bdiet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi l-linji gwida eżistenti u tiżviluppa linji gwida ġodda għall-iskrinjar u l-ittestjar ta' sustanzi li potenzjalment ifixklu s-sistema endokrinali. Element minnhom tal-attività kien li tiġi żviluppata Linja Gwida tat-Test għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali tal-ispeċi tal-ħut. L-Assaġġ fuq 21 jum tal-Iskrinjar tas-Sistema Endokrinali tal-Ħut għadda minn programm estensiv ta' validazzjoni li jikkonsisti fi studji interlaboratorji b'sustanzi kimiċi magħżula biex jintwerew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ fid-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi u li jinibixxu l-aromataži (1, 2, 3, 4, 5) fit-tliet speċijiet ta' ħut investigati (il-karpjun buras, il-medaka Ġappuniża u ż-żebra); id-detezzjoni ta' attività androġenika hija possibbli fil-karpjun buras u fil-medaka, iżda mhux fiż-żebra. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jippermettix id-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi antiandroġeniċi. Il-ħidma ta' validazzjoni ġiet riveduta permezz ta' evalwazzjoni bejn il-pari minn bord ta' esperti maħtura mill-Koordinaturi Nazzjonali tal-Programm tal-Linji Gwida tat-Test (6). L-assaġġ mhuwiex imfassal biex jidentifika mekkaniżmi speċifiċi ta' tfixkil ormonali peress li l-annimali tat-test għandhom assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali (HPG) intatta, li jista' jkollha rispons għal sustanzi kimiċi li għandhom impatt fuq l-assi HPG f'livelli differenti. L-assaġġ tar-Riproduzzjoni tal-Ħut Fuq Żmien Qasir (TG 229 tal-OECD) jinkludi l-fekondità u, kif xieraq, l-istopatoloġija gonadali għall-karpjun buras, kif ukoll il-punti ta' tmiem kollha inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar. It-TG 229 tal-OECD jipprovdi skrinjar tas-sustanzi kimiċi li jaffettwaw ir-riproduzzjoni permezz ta' mekkaniżmi varji inklużi l-modalitajiet endokrinali. Dan għandu jiġi kkunsidrat qabel ma jintagħżel l-aktar metodu xieraq ta' ttestjar.

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi assaġġ ta' skrinjar *in vivo* li fih ħut maskili sesswalment matur u ħut femminili li jkun qed ibid jinżammu flimkien u jiġu esposti għal sustanza kimika matul sehem limitat miċ-ċiklu tal-ħajja tagħhom (21 jum). Fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni ta' 21 jum, skont l-ispeċi li tkun qed tintuża, jitkejjel punt ta' tmiem bijomarkatur wieħed jew tnejn fl-irġiel u n-nisa bħala indikatur ta' inibizzjoni estroġenika, tal-aromataži jew tal-attività androġenika tas-sustanza kimika tat-test; dawn il-punti ta' tmiem huma l-vitelloġenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji. Il-vitelloġenina titkejjel fil-karpjun buras, fil-medaka Ġappuniża u fiż-żebra, filwaqt li l-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karpjun buras u l-medaka Ġappuniża biss.

3. Dan il-bijoassaġġ iservi bħala assaġġ ta' skrinjar *in vivo* għal ċerti modi ta' kif taħdem is-sistema endokrinali u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi li Jfixklu s-Sistema Endokrinali" (28).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. Normalment il-vitelloġenina tiġi prodotta mill-fwied ta' vertebrati ovipari nisa bħala rispons għall-estroġenu endoġenu li jkun qed jiċċirkola. Hija prekursur tal-proteini tal-isfar tal-bajd u, ladarba tiġi prodotta fil-fwied, tgħaddi mad-demm u tidħol fl-ovarji, fejn tiġi assorbita u modifikata mill-bajd li jkun qed jiżviluppa. Il-vitelloġenina hija kważi intraċċabbli fil-plażma ta' ħut femminili u maskili immaturi għaliex m'għandhomx biżżejjed estroġenu jiċċirkola; madankollu, il-fwied kapaċi jissintetizza u jnixxi l-vitelloġenina bħala rispons għal stimulazzjoni tal-estroġenu eżoġenu.

▼**M6**

5. Il-kejl tal vitelloġenina jservi għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom diversi modi ta' azzjoni estroġenika. Id-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi tista' ssir bil-kejl tal-induzzjoni tal-vitelloġenina fil-ħut maskili, u ġiet dokumentata sew fil-letteratura xjentifika evalwata bejn il-pari (eż. (7)). L-induzzjoni tal-vitelloġenina ntweriet ukoll wara espożizzjoni għal androġeni aromatizzabbli(8, 9). Tnaqqis fil-livell ta' estroġenu li jiċċirkola fin-nisa, pereżempju permezz tal-inibizzjoni tal-aromataži li tikkonverti l-androġenu endoġenu f'estroġenu naturali 17β-estradjol, jikkawża tnaqqis fil-livellta' vitelloġenina, li jintuża għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom karatteristiċi inibitorji tal-aromataži (10, 11). Ir-rilevanza bijoloġika tar-rispons tal-vitelloġenina wara inibizzjoni estroġenika/tal-aromataži hija stabbilita u ġiet dokumentata b'mod estensiv. Madankollu, huwa possibbli wkoll li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata mit-tossiċità ġenerali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità.

6. Ġew żviluppati b'suċċess diversi metodi ta' kejl u dawn ġew standardizzati għall-użu ta' rutina. Dan huwa l-każ fil-metodi ta' Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku (ELISA) speċifiċi għall-ispeċi li jużaw l-immunokimika għall-kwantifikazzjoni tal-vitelloġenina prodotta f'kampjuni żgħar tad-demm jew tal-fwied miġbura minn ħut individwali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Għall-kejl tal-VTG jittieħed kampjun tad-demm tal-karpjun buras, id-demm taż-żebra jew l-omoġenat tar-ras/denb, u l-fwied tal-medaka. Fil-medaka, hemm korrelazzjoni tajba bejn il-VTG imkejla mid-demm u mill-fwied (19). L-Appendiċi 6 jipprovdi l-proċeduri rrakkomandati għall-ġbir tal-kampjuni għall-analiżi tal-vitelloġenina. Kits għall-kejl tal-vitelloġenina jistgħu jinkisbu faċilment; dawn il-kits għandhom ikunu bbażati fuq metodu ELISA vvalidat li jkun speċifiku għall-ispeċi.

7. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji f'ħut maskili ta' ċerti speċijiet jidhru fuq barra, huma kwantifikabbli u jirrispondu għal-livelli ta' androġeni endoġeni li jiċċirkolaw; dan huwa l-każ għall-karpjun buras u l-medaka — iżda mhux għaż-żebra, li m'għandhiex karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli. In-nisa jżommu l-kapaċità li jiżviluppaw karatteristiċi sesswali sekondarji maskili, meta jiġu esposti għal sustanzi kimiċi androġeniċi fl-ilma. Hemm bosta studji disponibbli fil-letteratura xjentifika li jiddokumentaw dan it-tip ta' rispons fil-karpjun buras (20) u fil-medaka (21). Tnaqqis fil-karatteristiċi sesswali sekondarji fl-irġiel għandu jiġi interpretat b'kawtela minħabba saħħa statistika dgħajfa, u għandu jkun ibbażat fuq ġudizzju espert u l-piż tal-evidenza. Hemm limitazzjonijiet dwar l-użu taż-żebra f'dan assaġġ, minħabba n-nuqqas ta' karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli li jirrispondu għal sustanzi kimiċi b'effetti androġeniċi.

8. Fil-karpjun buras, l-indikatur ewlieni ta' espożizzjoni androġenika eżoġena huwa l-għadd ta' tuberkuli tan-namra (*nuptial tubercles*) li jinsabu fuq imnieħer il-ħuta femminili. Fil-medaka, l-għadd ta' proċessi papillari jikkostitwixxi l-markatur ewlieni ta' espożizzjoni eżoġena għal sustanzi kimiċi androġeniċi f'ħut femminili. L-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B jindikaw il-proċeduri rrakkomandati li għandhom jiġu segwiti għall-valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali fil-karpjun buras u fil-medaka, rispettivament.

9. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Fl-assaġġ, il-ħut maskili u dawk femminili li jkunu fi stat riproduttiv jiġu esposti f'reċipjenti tat-test flimkien. L-istat adult u riproduttiv tagħhom jippermetti sabiex issir differenzjazzjoni ċara bejn is-sessi, u b'hekk tkun tista' ssir analiżi relatata mas-sess ta' kull punt ta' tmiem, u jiżgura s-sensittività tagħhom lejn sustanzi kimiċi esoġeni. Fi tmiem it-test, is-sess jiġi

▼M6

kkonfermat permezz ta' eżami makroskopiku tal-gonadi wara ftuħ ventrali tal-addome b'imqass. Fl-Appendiċi 2 tingħata ħarsa ġenerali lejn il-kundizzjonijiet rilevanti tal-bijoassaġġ. Normalment l-assaġġ jinbeda b'kampjun ta' ħut minn popolazzjoni li tkun f'kundizzjoni riproduttiva; m'għandhomx jintużaw annimali li qed jixjieħu. Fis-sezzjoni dwar l-Għażla tal-ħut hija pprovduta gwida dwar l-età tal-ħut u dwar l-istatus riproduttiv. L-assaġġ isir permezz ta' tliet konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi li jintużaw għall-espożizzjoni kif ukoll kontroll tal-ilma, u kontroll tas-solvent jekk ikun hemm bżonn. Għal kull trattament jintużaw żewġ reċipjenti jew repliki (kull reċipjent ikun fih 5 irġiel u 5 nisa) fil-medaka u ż-żebra, filwaqt li fil-karpjun buras jintużaw erba' reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 2 irġiel u 4 nisa). Dan isir biex tiġi akkomodata l-imġiba territorjali tal-karpjun buras maskili filwaqt li jinżamm assaġġ b'saħħtu biżżejjed. L-espożizzjoni ssir għal 21 jum u l-kampjunar tal-ħut isir fil-21 jum ta' espożizzjoni.

11. Mal-kampjunar fil-jum 21, l-annimali kollha jinqatlu bla tbatija. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karpjun buras u fil-medaka (ara l-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B); fiż-żebra u l-karpjun buras jinġabru kampjuni tad-demm għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina, inkella jistgħu jinġabru r-ras/denb għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina fiż-żebra (Appendiċi 6); fil-medaka l-fwied jinġabar għall-analiżi tal-VTG (Appendiċi 6).

IL-KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI TAT-TEST

12. Biex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità fil-kontrolli tal-ilma (jew tas-solvent) m'għandhiex taqbeż l-10 % fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni;

— matul il-perjodu ta' espożizzjoni l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għandha tilħaq minimu ta' 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV);

— it-temperatura tal-ilma fir-reċipjenti tat-test qatt m'għandha tvarja b'iktar minn ± 1,5 °C matul il-perjodu ta' espożizzjoni u din għandha tinżamm fi ħdan 2 °C tal-meded ta' temperaturi speċifikati għall-ispeċi tat-test (Appendiċi 2);

— l-evidenza għandha tkun disponibbli biex jintwera li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-valuri medji mkejlin.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

13. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

(a) ossiġenometri u apparati li jkejlu l-pH;

(b) tagħmir għad-determinazzjoni tal-ebusija u l-alkalinità tal-ilma;

(c) apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment monitoraġġ kontinwu;

(d) tankijiet magħmulin minn materjal kimiku inerti u ta' kapaċità adattata b'rabta mad-densità rrakkomandata tat-tagħbija u tal-istokkjar (ara l-Appendiċi 2);

(e) sottostrat tal-bidien għall-karpjun buras u ż-żebra, l-Appendiċi 4 jagħti d-dettalji neċessarji;

(f) bilanċ preċiż biżżejjed (jiġifieri preċiż sa ± 0,5mg).

▼M6

Ilma

14. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwat fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' ± 0,5 unitajiet tal-pH. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma tad-dilwizzjoni ma jinfluwenzax bla bżonn ir-riżultat tat-test (pereżempju billi jbiddel is-sustanza kimika tat-test; kull ċertu żmien għandhom jittieħdu kampjuni biex jiġu analizzati). Fejn l-ilma tad-dilwizzjoni ikun magħruf li huwa relattivament kostanti fil-kwalità, il-kejl ta' metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, u Ni), ta' anjoni u katjoni ewlenin (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, u SO_4^{2-}), ta' pestiċidi (eż. pestiċidi organofosforiċi totali u pestiċidi organokloriniċi totali), ta' karbonju organiku u ta' solidi sospiżi totali għandu jsir, pereżempju, kull tliet xhur. Jekk ikun intwera li l-kwalità tal-ilma hija kostanti matul tal-anqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jkunu inqas spissi u l-intervalli jistgħu jittawlu (eż. kull sitt xhur). Xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma b'dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 3.

Is-soluzzjonijiet tat-test

15. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin jiġu preparati billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Idealment, is-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi ppreparata permezz ta' sempliċi tħallit jew theżżiż tas-sustanza kimika tat-test f'ilma tad-dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. tħawwid jew ultrasonikazzjoni). Biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija konċentrata adegwata jistgħu jintużaw kolonni ta' saturazzjoni (kolonni ta' solubilità). L-użu ta' portatur ta' solvent mhuwiex rakkomandat. Madankollu, f'każ li jkun hemm bżonn ta' solvent, fl-istess ħin għandu jsir solvent ta' kontroll ukoll, fl-istess konċentrazzjoni tas-solvent bħat-trattamenti kimiċi. Għal sustanzi kimiċi tat-test diffiċili, teknikament solvent jista' jkun l-aħjar soluzzjoni; għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċili (22). L-għażla tas-solvent tiġi determinata mill-karatteristiċi kimiċi tas-sustanza kimika. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD jirrakkomanda massimu ta' 100 µl/l, li għandu jiġi osservat. Madankollu reviżjoni reċenti (23) enfasizzat fuq tħassib addizzjonali meta jintużaw solventi għall-ittestjar tal-attività fis-sistema endokrinali. Għalhekk, huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjoni tas-solvent, jekk ikun meħtieġ, tiġi minimizzata meta dan ikun teknikament fattibbli (skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test).

16. Għandha tintuża sistema ta' test bi fluss kontinwu. Sistema bħal din tiddistribwixxi u tiddilwixxi b'mod kontinwu soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) sabiex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u tal-ilma tad-dilwizzjoni għandhom jiġu ċċekkjati kull ċertu żmien, idealment kuljum, matul it-test u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik ta' grad baxx jew materjal ieħor li jista' jkun fih sustanzi kimiċi bijoloġikament attivi. Meta jkun qed jintgħażel il-materjal għas-sistema bi fluss kontinwu, għandha titqies il-possibilità li s-sustanza kimika tat-test tiġi adsorbita f'dan il-materjal.

Iż-żamma tal-ħut

17. Il-ħut tat-test għandu jintgħażel minn popolazzjoni tal-laboratorju, idealment minn stokk wieħed, li jkun idderra għal mill-inqas ġimgħatejn qabel it-test fil-kondizzjonijiet ta' kwalità tal-ilma u ta' illuminazzjoni li jkunu simili għal dawk użati fit-test. Importanti li r-rata tat-tagħbija u d-densità tal-istokkjar (għad-definizzjonijiet, ara l-Appendiċi 1) jkunu xierqa għall-ispeċi tat-test użata (ara l-Appendiċi 2).

18. Wara perjodu ta' 48 siegħa li fih il-ħut jitħallew joqogħdu, jiġu rreġistrati l-mortalitajiet u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

▼M6

— mortalitajiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-lott kollu jitwarrab;

— mortalitajiet ta' bejn 5 % u 10 % tal-popolazzjoni: akklimatizzazzjoni għal sebat ijiem oħra; jekk ikun hemm mortalità oħla minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, il-lott kollu jitwarrab;

— mortalitajiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-lott jiġi aċċettat

19. Matul il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, fil-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni, jew matul il-perjodu ta' espożizzjoni l-ħut m'għandux jingħata kura għal mard.

Preespożizzjoni u l-għażla tal-ħut

20. Huwa rrakkomandat li jkun hemm perjodu ta' preespożizzjoni ta' ġimgħa, li matulu l-annimali jitqiegħdu f'reċipjenti simili għal dawk tat-test innifsu. Matul il-perjodu ta' żamma u matul il-fażi ta' espożizzjoni l-ħut għandhom jintemgħu *ad libitum*. Il-fażi ta' espożizzjoni tinbeda b'ħut adulti sesswalment dimorfiku minn provvista tal-laboratorju ta' annimali maturi biżżejjed għar-riproduzzjoni (eż. b'karatteristiċi sesswali sekondarji li jidhru fir-rigward tal-karpjun buras u l-medaka), u li jkunu qed ibidu b'mod attiv. Għal gwida ġenerali biss (u dan ma għandux jitqies mingħajr l-osservazzjoni tal-istatus riproduttiv propju ta' lott partikolari ta' ħut), il-karpjuni buras għandu jkollhom madwar 20 (± 2) ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkolturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul ħajjithom. Il-medaka Ġappuniża għandu jkollha madwar 16 (± 2)–il ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul ħajjithom. Iż-żebra għandu jkollhom madwar 16 (± 2)-il ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 26 ± 2 °C matul ħajjithom.

ID-DISINN TAT-TEST

21. Jintużaw tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, kontroll wieħed (tal-ilma) u, jekk ikun hemm bżonn, kontroll tas-solvent. Id-dejta tista' tiġi analizzata sabiex jiġu determinati differenzi statistikament sinifikanti bejn ir-risponsi għat-trattament u għall-kontroll. Dawn l-analiżijiet ser jindikaw jekk hemmx il-ħtieġa ta' ittestjar ulterjuri aktar fit-tul għal effetti avversi (jiġifieri, sopravivenza, żvilupp, tkabbir u riproduzzjoni) għas-sustanza kimika, aktar milli għall-użu fil-valutazzjoni tar-riskju (24).

22. Għaż-żebra u l-medaka, fil-jum 21 tal-esperiment, l-irġiel u n-nisa minn kull livell ta' trattament (5 irġiel u 5 nisa f'kull wieħed miż-żewġ repliki) u mill-kontroll(i) jiġu kampjunati għall-kejl tal-vitelloġenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji, fejn applikabbli. Għall-karpjun buras, fil-jum 21 ta' espożizzjoni, l-irġiel u n-nisa (2 irġiel u 4 nisa f'kull wieħed mill-erba' repliki) u mill-kontroll(i) jiġu kampjunati għall-kejl tal-vitelloġenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji.

L-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

23. Għall-finijiet ta' dan it-test, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tiġi stabbiliti mill-konċentrazzjoni massima tollerata (MTC) li tiġi ddeterminata minn *range finder* jew minn dejta oħra dwar it-tossiċità, jew 10 mg/l, jew is-solubilità massima fl-ilma, skont liema tkun l-aktar baxxa. L-MTC hija definita bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test tas-sustanza kimika li twassal għal mortalità ta' inqas minn 10 %. L-użu ta' dan l-approċċ jassumi li teżisti dejta empirika dwar tossiċità akuta jew dejta oħra dwar it-tossiċità li minnha tista' tiġi stmata l-MTC. L-istima tal-MTC tista' ma tkunx eżatta u normalment teħtieġ ċertu ġudizzju professjonali.

▼M6

24. Huma meħtieġa tliet konċentrazzjonijiet tat-test, spazjati b'fattur kostanti li ma jaqbiżx l-10, u kontroll ta' ilma tad-dilwizzjoni (u kontroll tas-solvent jekk ikun meħtieġ). Huwa rrakkomandat li l-fatturi ta' spazjar jkunu f'firxa ta' bejn 3.2 u 10.

PROĊEDURA

L-għażla u l-użin tal-ħut tat-test

25. Huwa importanti li fil-bidu tal-assaġġ tiġi minimizzata l-varjazzjoni fil-piż tal-ħut. Il-meded ta' daqsijiet adattati għall-ispeċi differenti rrakkomandati għall-użu f'dan it-test huma mogħtija fl-Appendiċi 2. Għal-lott kollu ta' ħut użat fit-test, il-medda tal-piżijiet individwali għall-ħut maskili u femminili fil-bidu tat-test għandha, jekk possibbli, tinżamm bejn ± 20 % tal-piż medju aritmetiku tal-istess sess. Huwa rrakkomandat li qabel it-test jintiżen sotto-kampjun tal-istokk tal-ħut sabiex jiġi stmat il-piż medju.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni

Durata

26. It-test idum għaddej 21 jum, wara perjodu ta' preespożizzjoni. Il-perjodu rrakkomandat ta' preespożizzjoni huwa ta' ġimgħa.

Tmigħ

27. Il-ħut għandhom jintemgħu *ad libitum* b'ikel adattat (Appendiċi 2) b'rata suffiċjenti biex tinżamm il-kundizzjoni tal-ġisem. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tkabbir mikrobiku u turbidità fl-ilma. Bħala gwida ġenerali, ir-razzjon ta' kuljum jista' jinqasam f'żewġ jew tliet porzjonijiet ugwali għal tmigħ multiplu kuljum, separat b'mill-inqas tliet sigħat bejn kull tmigħ. Huwa aċċettabbli li jingħata razzjon akbar uniku b'mod partikolari għat-tmiem il-ġimgħa. Il-ħut m'għandux jingħata x'jiekol għal 12-il siegħa qabel il-kampjunar/nekroskopija.

28. L-ikel tal-ħut għandu jiġi evalwat għall-preżenza ta' kontaminanti bħal pestiċidi organokloriniċi, idrokarboni aromatiċi poliċikliċi (PAHs), bifenili poliklorinati (PCBs). Għandu jiġi evitat ikel b'livell għoli ta' fitoestroġeni li jista' jikkompromietti r-rispons tal-assaġġ għal agonisti magħrufa tal-estroġenu (eż. 17-beta estradiol).

29. Ikel mhux mikul u materjal tar-rawt għandu jitneħħa mir-reċipjent tat-test tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa, eż. billi l-qiegħ ta' kull tank jitnaddaf sew permezz ta' sifun.

Dawl u temperatura

30. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu adattati għall-ispeċi tat-test (ara Appendiċi 2).

Il-frekwenza tad-determinazzjonijiet analitiċi u tal-kejl

31. Qabel jibda l-perjodu ta' espożizzjoni, għandu jiġi żgurat li s-sistema tat-twassil tas-sustanza kimika taħdem kif suppost. Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi kollha meħtieġa, inkluż għarfien suffiċjenti dwar l-istabbiltà kimika fis-sistema tat-test. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli regolari, kif ġej: idealment, ir-rati tal-fluss tas-soluzzjoni ewlenija dilwenti u tossikanti għandhom jiġu vverifikati kuljum, iżda tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa, u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test innifsu jitkejlu fir-reċipjenti kollha fil-bidu tat-test u f'intervalli ta' ġimgħa wara dan.

32. Huwa rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla.

33. Il-kampjuni jistgħu jeħtieġu jiġu ffiltrati (eż., bl-użu ta' pori ta' 0,45 μm) jew jiġu ċentrifugati. Jekk ikun hemm bżonn, imbagħad iċ-ċentrifugazzjoni hija l-proċedura rrakkomandata. Madankollu, jekk il-materjal tat-test ma jiġix adsorbit mill-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll.

▼M6

34. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, it-temperatura, u l-pH għandhom jitkejlu fir-reċipjenti kollha tat-test tal-inqas darba fil-ġimgħa. L-ebusija u l-alkalinità totali għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed fl-ogħla konċentrazzjoni tal-anqas darba fil-ġimgħa. Idealment, it-temperatura għandha tiġi ssorveljata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wieħed tat-test.

Osservazzjonijiet

35. Għadd ta' risponsi ġenerali (eż. sopravivenza) u r-risponsi bijoloġiċi ewlenin (eż. il-livelli tal-vitelloġenina) jiġu vvalutati matul l-assaġġ jew fi tmiem l-assaġġ. Il-kejl u l-valutazzjoni ta' dawn il-punti ta' tmiem u l-utilità tagħhom huma deskritti hawn taħt.

Sopravivenza

36. Matul il-perjodu tat-test, il-ħut għandu jiġi eżaminat kuljum u kwalunkwe mortalità għandha tiġi rreġistrata u l-ħut mejjet għandu jitneħħa malajr kemm jista' jkun. Il-ħut mejjet m'għandux jiġi sostitwit la fir-reċipjent tal-kontroll u lanqas fir-reċipjent tat-trattament. Is-sess tal-ħut li jmut matul it-test għandu jiġi determinat permezz ta' evalwazzjoni makroskopika tal-gonadi.

Imġiba u dehra

37. Għandha tittieħed nota ta' kwalunkwe mġiba abnormali (relatata mal-kontrolli); din tista' tinkludi sinjali ta' tossiċità ġenerali inklużi ipervent-ilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, telf tal-bilanċ, u inattivitá jew tmigħ mhux tas-soltu. Barra minn hekk għandha tittieħed nota ta' anormalitajiet esterni (bħal emorraġija, skolorazzjoni). Dawn is-sinjali ta' tossiċità għandhom jiġu kkunsidrati bir-reqqa waqt l-interpretazzjoni tad-dejta peress li jistgħu jindikaw konċentrazzjonijiet li fihom il-bijomarkaturi ta' attività endokrinali ma jkunux affidabbli. Dawn l-osservazzjonijiet tal-imġiba jistgħu anke jipprovdu informazzjoni kwalitattiva biex jinkiseb tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-ħut. Per eżempju, fil-karpjuni buras, f'irġiel normali jew f'nisa b'karatteristiċi maskili ġiet osservata aggressività territorjali matul espożizzjoni androġenika; fiż-żebra, l-imġiba karatteristika ta' tgħammir u riproduzjoni wara jinxtegħel id-dawl tiddgħajjef jew tiġi mfixkla minn espożizzjoni estroġenika jew antiandroġenika.

38. Peress li xi aspetti tad-dehra (primarjament il-kulur) jistgħu jinbidlu malajr bit-tqandil, importanti li l-osservazzjonijiet kwalitattivi jsiru qabel ma l-annimali jitneħħew mis-sistema tat-test. L-esperjenza miksuba s'issa bil-karpjuni buras tissuġġerixxi li għall-ewwel xi sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi esterni li ġejjin: il-kulur tal-ġisem (ċar jew skur), mudelli ta' kolorazzjoni (il-preżenza ta' strixxi vertikali), u l-forma tal-ġisem (ir-ras u r-reġjun pettorali). Għal-hekk, l-osservazzjonijiet dwar id-dehra fiżika tal-ħut għandhom isiru matul it-test, u fi tmiem l-istudju

Il-qtil bla tbatija tal-ħut

39. Fil-jum 21, jiġifieri fi tmiem l-espożizzjoni, il-ħut għandu jiġi ewtanizzat b'ammonti xierqa ta' Trikaina (Trikaina metan sulfonat, Metakaina, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l ibbaferjat bi 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonat tas-sodju, CAS 144-55-8) biex titnaqqas l-irritazzjoni fil-membrana mukuża; imbagħad jittieħed kampjun tad-demm jew it-tessut għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina, kif spjegat fis-sezzjoni tal-Vitelloġenina.

▼**M6**

Osservazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji

40. Ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (l-għadd ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjun buras maskili, il-proċessi papillari fil-medaka maskili). B'mod partikulari, sustanzi kimiċi li jkollhom ċerti modi ta' azzjoni jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fl-annimali tas-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal trenbolon, metiltestosteron u diidrotestosteron, jistgħu jwasslu sabiex il-karpjuni buras femminili jiżviluppaw tuberkuli tan-namra prominenti jew sabiex il-medaka femminili tiżviluppa proċessi papillari (11, 20, 21). Ġie rrapportat ukoll li l-agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-għadd tat-tuberkuli tan-namra u d-daqs tal-kuxxinett tal-kozz dorsali f'irġiel adulti (25, 26). Dawn l-osservazzjonijiet morfoloġiċi grossi jistgħu jipprovdu tagħrif kwalitattiv u kwantitattiv siewi biex jingħata tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-ħut. L-għadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjun buras u l-proċessi papillari fil-medaka jistgħu jiġu kkwantifikati b'mod dirett jew b'mod aktar prattiku f'kampjuni ppreservati. Il-proċeduri rrakkomandati għall-evalwazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras u l-medaka huma disponibbli mill-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B, rispettivament.

Vitelloġenina (VTG)

41. Id-demm jinġabar mill-arterja/vina kawdali permezz ta' tubulu kapillari mikroematokritiku eparinizzat, jew inkella permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa. Skont kemm hi kbira l-ħuta, il-volumi tad-demm li jistgħu jinġabru ġeneralment ivarjaw bejn 5 u 60 µl għal kull ħuta individwali għall-karpjuni buras u minn 5-15 µl għal kull ħuta individwali għaż-żebra. Il-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni, u tinħażen ma' inibituri tal-proteażi f'temperatura ta' – 80 °C, sakemm tiġi analizzata għall-vitelloġenina. Inkella, fil-medaka jintuża l-fwied, u fiż-żebra l-omoġenat tar-ras/denb jista' jintuża bħala sors ta' tessut għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina (Appendiċi 6). Il-kejl tal-VTG għandu jkun imsejjes fuq metodu ELISA omologu vvalidat, bl-użu ta' standard omologu tal-VTG u antikorpi omologi. Huwa rrakkomandat li jintuża metodu li jkun kapaċi jiskopri livelli ta' VTG baxxi daqs ftit ng/ml fil-plażma (jew ng/mg fit-tessut), li huwa l-livell ta' sfond f'ħut maskili li ma jkunx ġie espost.

42. Il-kontroll tal-kwalità tal-analiżi tal-vitelloġenina jintlaħaq permezz tal-użu ta' standards, bjanki u tal-anqas analiżijiet duplikati. Għal kull metodu ELISA, għandu jsir test għall-effett matriċi (effett ta' dilwizzjoni ta' kampjun) biex jiġi determinat il-fattur minimu tad-dilwizzjoni tal-kampjun. Kull platt ELISA li jintuża għall-assaġġi tal-VTG għandu jinkludi l-kampjuni tal-kontroll tal-kwalità li ġejjin: tal-anqas 6 standards ta' kalibraġġ li jkopru l-firxa ta' konċentrazzjonijiet mistennija tal-vitelloġenina, u tal-anqas bjank tal-assaġġ mhux speċifiku wieħed (analiżi duplikata). L-assorbiment ta' dawn il-bjanki għandu jkun ta' anqas minn 5 % tal-assorbiment standard massimu ta' kalibrazzjoni. Minn kull kampjun ta' dilwizzjoni jiġu analizzati tal-anqas żewġ alikwoti (*well-duplicates*). *Well-duplicates* li jvarjaw b'aktar minn 20 % għandhom jerġgħu jiġu analizzati.

43. Il-koeffiċjent tal-korrelazzjoni (R^2) għall-kurvi ta' kalibrazzjoni għandu jkun ta' aktar minn 0,99. Madankollu, korrelazzjoni għolja mhijiex biżżejjed biex tiggarantixxi tbassir adegwat tal-konċentrazzjoni fil-meded kollha. Minbarra li jkun hemm korrelazzjoni għolja biżżejjed għall-kurva ta' kalibrazzjoni, il-konċentrazzjoni ta' kull standard, kif ikkalkolata mill-kurva ta' kalibrazzjoni, dejjem għandha taqa' bejn 70 u 120 % tal-konċentrazzjoni nominali tiegħu.

▼M6

Jekk il-konċentrazzjonijiet nominali jxaqilbu lil hinn mil-linja ta' rigressjoni tal-kalibrazzjoni (eż. f'konċentrazzjonijiet inqas), jista' jkun ħemm bżonn li l-kurva ta' kalibrazzjoni tinqasam f'meded baxxi u għoljin jew li jintuża mudell nonlineari li jaqbel b'mod adegwat mad-dejta dwar l-assorbiment. Jekk il-kurva tinqasam, iż-żewġ segmenti tal-linja għandu jkollhom $R^2 > 0,99$.

44. Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku, u l-limitu ta' kwantitazzjoni (LOQ) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku mmoltiplikata bl-inqas fattur ta' dilwizzjoni.

45. F'kull jum li fih isiru l-assaġġi tal-vitelloġenina għandu jiġi analizzat kampjun ta' fortifikazzjoni permezz ta' standard ta' referenza interassaġġi (Appendiċi 7). Il-proporzjon tal-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla jiġi rrapportat flimkien mar-riżultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

DEJTA U RAPPORTAR

Valutazzjoni tar-Risposti tal-Bijomarkatur permezz ta' Analiżi tal-Varjanza (ANOVA)

46. Biex tiġi identifikata l-attività endokrinali potenzjali ta' sustanza kimika, ir-risposti jitqabblu bejn il-gruppi ta' trattament u ta' kontroll permezz ta' analiżi tal-varjanza (ANOVA). Meta jintuża kontroll tas-solvent, għandu jsir test statistiku xieraq bejn il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u l-kontroll tas-solvent għal kull punt ta' tmiem. Gwida dwar kif titratta d-dejta dwar il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u dik dwar is-solvent fl-analiżi statistika sussegwenti tista' tinstab fl-OECD, 2006c (27). Id-dejta kollha dwar ir-rispons bijoloġiku għandha tiġi analizzata u rrapportata separatament skont is-sess. Jekk ma jintlaħqux is-suppożizzjonijiet meħtieġa għall-metodi parametriċi — distribuzzjoni mhux normali (eż. it-test ta' Shapiro-Wilk) jew varjanza eteroġena (it-test ta' Bartlett jew it-test ta' Levene), għandha tiġi kkunsidrata l-possibilità li d-dejta tiġi konvertita f'varjanzi omoġenizzati qabel ma ssir l-ANOVA, jew qabel ma ssir ANOVA ppeżata. It-test ta' Dunnett (parametriku) fuq tqabbiliet multipli bejn pari jew it-test ta' Mann-Whitney b'aġġustament Bonferroni (mhux parametriku) jista' jintuża għal rispons mhux monotonu għad-doża. Jekk ir-rispons għad-doża ikun kważi monotonu jistgħu jintużaw testijiet statistiċi oħra (eż. it-test ta' Jonckheere-Terpstra jew it-test ta' Williams). Fl-Appendiċi 8 ġiet ipprovduta flowchart statistika biex tgħin fid-deċiżjoni dwar l-aktar test statistiku xieraq li għandu jintuża. Tagħrif addizzjonali jista' jinkiseb ukoll mid-Dokument tal-OECD dwar Approċċi Attwali lejn l-Analiżi Statistika ta' Dejta dwar l-Ekotossiċità (27).

Rapportar tar-riżultati tat-test

47. Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

Il-faċilità ta' ttestjar:

— Persunal responsabbli u r-responsabbiltajiet ta' studju tagħhom

— Kull laboratorju għandu jkun wera profiċjenza fl-użu ta' firxa ta' sustanzi kimiċi rappreżentattivi

Is-sustanza kimika tat-test:

— Karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

— In-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti

▼**M6**

— Il-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tat-test

— Informazzjoni dwar l-istabbiltà u l-bijodegradabilità

Solvent:

— Karatterizzazzjoni tas-solvent (in-natura, il-konċentrazzjoni użata)

— Ġustifikazzjoni tal-għażla tas-solvent (jekk ma jkunx ilma)

Annimali tat-test:

— L-ispeċi u r-razza

— Il-fornitur u l-faċilità speċifika tal-fornitur

— L-età tal-ħut fil-bidu tat-test u l-istatus ta' riproduzzjoni

— Dettalji tal-proċedura ta' akklimatizzazzjoni tal-annimali

— Il-piż tal-ġisem tal-ħut fil-bidu tal-espożizzjoni (minn sottokampjun tal-istokk tal-ħut)

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-proċedura tat-test użata (it-tip tat-test, ir-rata tat-tagħbija, id-densità tal-istokkjar, eċċ.);

— Il-metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u r-rata tal-fluss;

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test imkejla kull ġimgħa u l-metodu analitiku użat, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard fir-reċipjenti tat-test u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni vera;

— Il-karatteristiċi tal-ilma tad-dilwizzjoni (inkluż il-pH, l-ebusija, l-alkalinità, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlul, il-livelli ta' klorin residwu, il-karbonju organiku totali, is-solidi sospiżi u kwalunkwe kejl ieħor li jkun sar)

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test: il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlul;

— Informazzjoni ddettaljata dwar it-tmigħ (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont li ngħata u l-frekwenza u analiżijiet għal kontaminanti relevanti jekk disponibbli (eż. PCBs, PAHs u pestiċidi organoklorurati).

Riżultati

— Evidenza li l-kontrolli jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Dejta dwar il-mortalitajiet li jseħħu fi kwalunkwe konċentrazzjoni tat-test u fil-kontroll;

— Tekniki analitiċi statistiċi użati, it-trattament tad-dejta u ġustifikazzjoni tat-tekniki użati;

— Dejta dwar osservazzjonijiet bijoloġiċi ta' morfoloġija grossa, inklużi l-karatteristiċi sesswali sekondarji u l-vitelloġenina;

▼M6

— Riżultati tal-analiżi tad-dejta, idealment f'forma tabulari u grafika;

— Inċidenza ta' kwalunkwe reazzjoni mhux tas-soltu mill-ħut u kwalunkwe effett viżibbli kkawżat mis-sustanza kimika tat-test

GWIDA GĦALL-INTERPRETAZZJONI U L-AĊĊETTAZZJONI TAR-RIŻULTATI TAT-TEST

48. Din is-sezzjoni fiha ftit kunsiderazzjonijiet li għandhom jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test għad-diversi punti ta' tmiem imkejla. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'kawtela fejn is-sustanza kimika tat-test tidher li tkun qed tikkawża tossiċità evidenti jew li qed ikollha impatt fuq il-kundizzjoni ġenerali tal-annimal tat-test.

49. Meta tkun qed tiġi stabbilita l-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, għandha tingħata attenzjoni biex ma tinqabiżx il-konċentrazzjoni massima tollerata biex tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Importanti li tal-anqas ikun hemm trattament wieħed li fih ma jkunx hemm sinjali ta' effetti tossiċi. Sinjali ta' mard u sinjali ta' effetti tossiċi għandhom jiġu vvalutati u rrapportati f'ċertu dettall. Pereżempju, huwa possibbli li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata wkoll mit-tossiċità ġenerali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità. Madankollu, l-interpretazzjoni tal-effetti tista' tiġi sostnuta minn livelli oħra ta' kura li ma jitfixklux mit-tossiċità sistemika.

50. Hemm xi aspetti li wieħed irid iqis għall-aċċettazzjoni tar-riżultati tat-test. Bħala gwida, il-livelli tal-VTG fi gruppi ta' kontroll tal-irġiel u tan-nisa għandhom ikunu distinti u separati b'madwar tliet ordnijiet ta' kobor fil-karpjun buras u fiż-żebra, u b'madwar ordni uniku ta' kobor għall-medaka. Eżempji tal-medda ta' valuri li wieħed jista' jiltaqa' magħhom fil-gruppi ta' kontroll u ta' kura huma disponibbli fir-rapporti ta' validazzjoni (1, 2, 3, 4). Valuri għolja tal-VTG fl-irġiel ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-rispons tal-assaġġ u l-kapaċità tiegħu li jiskopri agonisti dgħajfa tal-estroġenu. Valuri baxxi tal-VTG fin-nisa ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-risponsività tal-assaġġ u l-ħila tiegħu li jiskopri inibituri tal-aromataži u antagonisti tal-estroġenu. Biex tinbena dik il-gwida ntużaw l-istudji ta' validazzjoni.

51. Jekk laboratorju ma jkunx għamel l-assaġġ qabel jew jekk ikunu saru bidliet sostanzjali (eż. bidla fir-razza tal-ħut jew tal-fornitur) huwa rrakkomandat li jsir studju tal-profiċjenza teknika. Huwa rrakkomandat li jintużaw sustanzi kimiċi li jkopru firxa ta' modi ta' azzjoni jew impatti fuq għadd tal-punti ta' tmiem tat-test. Fil-prattika, kull laboratorju huwa mħeġġeġ jibni dejta storika ta' kontroll propja għall-irġiel u għan-nisa u biex jagħmel kimika ta' kontroll pożittiv għall-attività estroġenika (eż. 17β-estradjol f'doża ta' 100 ng/l, jew agonist dgħajjef magħruf) li twassal għal żieda fil-VTG fil-ħut maskili, kimika ta' kontroll pożittiv għall-inibizzjoni tal-aromataži (eż. fadrozole jew prochloraz f'doża ta' 300 µg/l) li twassal għal tnaqqis fil-VTG fil-ħut nisa, u kimika ta' kontroll pożittiv għall-attività androġenika (eż. 17β-trenbolon f'doża ta' 5 µg/l) li twassal għall-induzzjoni ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras u l-medaka femminili. Din id-dejta kollha tista' titqabbel ma' dejta disponibbli mill-istudji ta' validazzjoni (1, 2, 3) biex tiġi żgurata l-profiċjenza tal-laboratorju.

52. B'mod ġenerali, il-kejl tal-vitelloġenina għandu jitqies pożittiv jekk ikun hemm żieda statistikament sinifikanti fil-VTG fl-irġiel ($p < 0,05$), jew tnaqqis statistikament sinifikanti fin-nisa ($p < 0,05$) tal-anqas fl-ogħla doża ttestjata meta mqabbla mal-grupp ta' kontroll, u fin-nuqqas ta' sinjali ta' tossiċità ġenerali. Riżultat pożittiv jikseb sostenn ikbar meta jintwera li hemm relazzjoni bijoloġikament plawżibbli bejn id-doża u l-kurva tar-rispons. Kif intqal qabel, it-tnaqqis fil-vitelloġenina jaf ma jkollux oriġini kompletament endokrinali; madankollu, ġeneralment riżultat pożittiv għandu jiġi interpretat bħala evidenza ta' attività endokrinali *in vivo*, u normalment għandu jagħti bidu għal azzjonijiet għal kjarifika ulterjuri.

▼**M6**

LETTERATURA

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (aċċessat fit-18/09/08).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1):121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Kxif b'suċċess ta' inibituri (anti-)androġeniċi u aromatase f'karpjuni buras adulti qabel ir-riproduzzjoni (Pimephales promelas) permezz ta' punti ta' tmiem li jitkejlu faċilment ta' żvilupp sesswali. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Applikazzjoni ta' ELISA għall-kwantifikazzjoni ta' konċentrazzjonijiet ta' vitelloġenin f'karpjuni buras (Pimephales promelas) esposti għal kimiċi li jfixklu l-endokrina. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/-MONO(2006)18

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/-MONO(2012)22

▼M6

Appendiċi 1

Abbrevjazzjonijiet u definizzjonijiet

Sustanza Kimika: Sustanza jew taħlita

CV: Koeffiċjent ta' varjazzjoni.

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku.

Rata ta' tagħbija: Piż bil-likwidu tal-ħut f'kull volum ta' ilma.

Densità tal-istokkjar: L-għadd ta' ħut f'kull volum ta' ilma.

VTG (Vitelloġenina): Prekursur tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment iseħħ f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

Assi HPG: Assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali.

MTC: Konċentrazzjoni Massima Tollerata, li tirrapreżenta madwar 10 % tal-LC_{50}.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qed tiġi ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M6

Appendiċi 2

Kundizzjonijiet sperimentali għall-assaġġ tal-iskrinjar tas-sistema endokrinali tal-ħut

1. Speċijiet Rakkomandati	**Karpjun buras** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Żebra** (*Danio rerio*)
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu
3. Temperatura tal-ilma	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')
5. Intensità tad-dawl	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)
6. Fotoperjodu (it-tranżizzjonijiet bejn tlugħ ix-xemx / nżul ix-xemx huma fakultattivi, madanakollu ma jitqisux neċessarji)	16-il siegħa ta' dawl, 8 sigħat ta' dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 sigħat dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 sigħat ta' dlam
7. Rata ta' tagħbija	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l
8. Daqs tal-kompartiment tat-test	10 l (minimu)	2 l (minimu)	5 l (minimu)
9. Volum tas-soluzzjoni tat-test	8 l (minimu)	1,5 l (minimu)	4 l (minimu)
10. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Minimu ta' 6 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum
11. Età tal-organiżmi tat-test	Ara l-paragrafu 20	Ara l-paragrafu 20	Ara l-paragrafu 20
12. Piż imxarrab approssimattiv tal-ħut adulti (g)	Nisa: 1,5 ± 20 % Irġiel: 2,5 ± 20 %	Nisa: 0,35 ± 20 % Irġiel: 0,35 ± 20 %	Nisa: 0,65 ± 20 % Irġiel: 0,4 ± 20 %
13. Nru ta' ħut f'kull reċipjent tat-test	6 (2 irġiel u 4 nisa)	10 (5 irġiel u 5 nisa)	10 (5 irġiel u 5 nisa)
14. Nru ta' trattamenti	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)
15. Nru ta' reċipjenti għal kull trattament	Minimu ta' 4	Minimu ta' 2	Minimu ta' 2
16. Nru ta' ħut għal kull konċentrazzjoni tat-test	16-il mara adulta u 8 irġiel (4 nisa u 2 irġiel f'kull reċipjent replika)	10 nisa adulti u 10 irġiel (5 nisa u 5 irġiel f'kull reċipjent irreplikat)	10 nisa adulti u 10 irġiel (5 nisa u 5 irġiel f'kull reċipjent irreplikat)
17. Reġim ta' tmigħ	Gambli adulti jew nauplii tal-ilma mielaħ ħajjin jew iffriżati darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn t'hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielaħ darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn t'hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielaħ darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn ta' hawn fuq

▼**M6**

18. Ossiġenazzjoni	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja
19. Ilma tad-dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif
20. Perjodu ta' preespożizzjoni	7 ijiem rakkomandati	7 ijiem rakkomandati	7 ijiem rakkomandati
21. Durata tal-espożizzjoni kimika	21 jum	21 jum	21 jum
22. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	sopravivenza imġiba karatteristiċi sesswali sekondarji VTG	sopravivenza imġiba karatteristiċi sesswali sekondarji VTG	sopravivenza imġiba VTG
23. Aċċettabilità tat-test	Ossiġenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 25 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossiġenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 24 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossiġenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 26 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.

▼**M6**

Appendiċi 3

Uħud mill-karatteristiċi kimiċi ta' ilma tad-dilwizzjini aċċettabbli

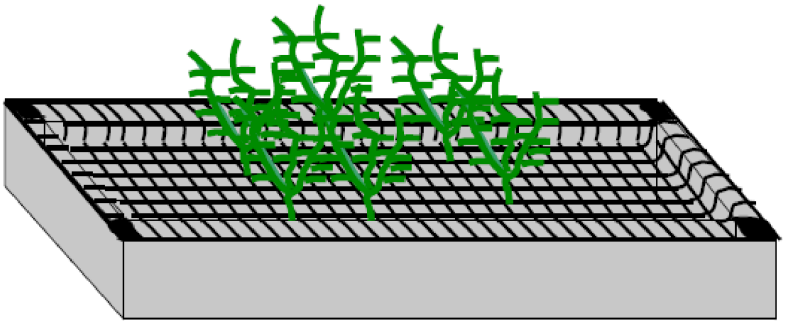
Komponent	Konċentrazzjonijiet
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Kloru residwu	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l

▼M6

Appendiċi 4A

Sottostrat għall-bidien għaż-żebra

Trej għall-bidien: dixx kollu tal-ħġieġ, per eżempju 22 × 15 × 5,5 cm (l × w × d), kopert b'kannizzata tal-azzar inossidabbli li tista' titneħħa (xibka wiesgħa 2 mm). Il-kannizzata għandha tgħatti l-bokka tad-dixx f'livell taħt ix-xifer.



Is-sottostrat tal-bidien għandu jitpoġġa fuq il-kannizzata. Għandu jipprovdi struttura biex il-ħut ikunu jistgħu jidħlu fiha. Pereżempju, pjanti artifiċjali tal-akkwarji magħmulin minn materjal aħdar tal-plastik huma tajbin (NB: għandu jitqies l-adsorbiment possibbli tal-kimika tat-test fil-materjal tal-plastik). Il-materjal tal-plastik għandu jitbattal f'volum suffiċjenti ta' ilma sħun għal tul ta' żmien suffiċjenti biex jiġi żgurat li ma tintreħa ebda sustanza kimika fl-ilma tat-test. Meta jkun qed jintuża materjal tal-ħġieġ għandu jiġi żgurat li l-ħut la jindarab u lanqas ma jkun iffullat matul l-azzjonijiet vigoruż tiegħu.

Id-distanza bejn it-trej u l-panewwi tal-ħġieġ għandha tkun ta' mill-inqas 3 cm biex jiġi żgurat li l-bidien ma jsirx barra mit-trej. Il-bajd li jitbied fuq it-trej jaqa' minn ġol-kannizzata u jista' jiġi kampjunat tliet kwarti sa siegħa wara l-bidu tal-illuminazzjoni. Il-bajd trasparenti ma jeħilx u jista' jingħadd faċilment permezz tal-użu ta' dawl transversali. Meta jkunu qed jintużaw ħames nisa f'kull reċipjent, sa 20 bajda f'ġurnata jistgħu jitqiesu bħala kwantità baxxa, sa 100 bħala medja u aktar minn 100 bħala kwantità għolja. It-trej tal-bidien għandu jitneħħa, il-bajd għandu jinġabar u t-trej tal-bidien għandu jerġa' jiddaħħal fir-reċipjent tat-test, jew l-aktar tard possibbli filgħaxija jew kmieni ħafna filgħodu. It-trej tal-bidien m'għandux jitħalla aktar minn siegħa biex jerġa' jiddaħħal peress li nkella s-sinjal tas-sottostrat tal-bidien jista' jinduċi tgħammir individwali u bidien fi żmien mhux tas-soltu. Jekk sitwazzjoni tkun teħtieġ li t-trej tal-bidien jiddaħħal aktar tard, dan għandu jsir mill-inqas 9 siegħat wara l-bidu tal-illuminazzjoni. F'dan il-ħin tard fil-ġurnata, il-bidien ma jibqax jiġi indott iktar.

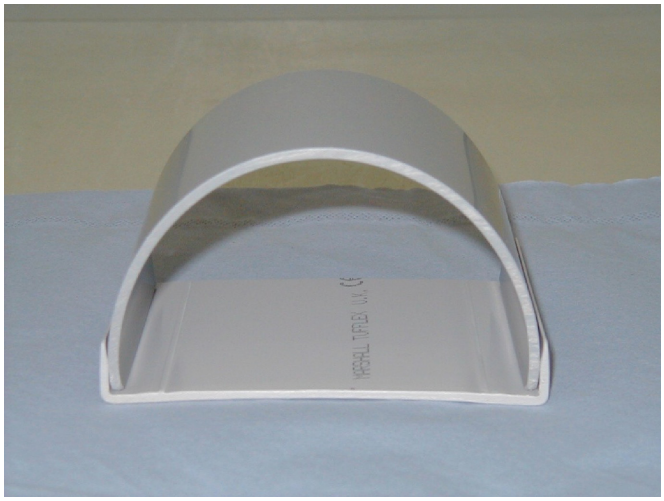
▼**M6**

Appendiċi 4B

Sottostrat tal-bidien għall-karpjun buras

F'kull kompartiment tat-test jitqiegħdu żewġ jew tliet madumiet jew trejs riproduttivi kkombinati tal-plastik/ċeramika/ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli (eż., kanal semiċirkulari griż twil 80 mm mqiegħed fuq trej bix-xoffa twil 130 mm) (ara l-istampa). Intwera li madum taċ-ċeramika jew tal-PVC akklimatizzati sew joqgħod bħala sottostrat tal-bidien (Thorpe *et al*, 2007).

Huwa rrakkomandat li l-madum jinbarax biex tittejjeb l-adeżjoni. It-trej għandu jiġi skrinjat ukoll biex il-ħut jitwaqqaf milli jaċċessa l-bajd li jkun waqa' sakemm ma tkunx intweriet effiċjenza tas-sottostrat tal-bidien użat fl-adeżjoni tal-bajd.



Il-bażi hija ddisinjata biex iżżomm kwalunkwe bajd li ma jeħilx mal-wiċċ tal-madum u għalhekk jaqa' f'qiegħ it-tank (jew dak il-bajd li jitbied direttament fuq il-bażi ċatta tal-plastik). Qabel jintużaw is-sottostrati tal-bidien għandhom jitbattlu lkoll għal mhux anqas minn 12-il siegħa, f'ilma tad-dilwizzjoni.

REFERENZI

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

Appendiċi 5A

Valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras għad-detezzjoni ta' ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali

Harsa ġenerali

Karatteristiċi potenzjalment importanti fid-dehra fiżika fil-karpjuni buras adulti fl-ittestjar għal sustanzi li jfixklu s-sistema endokrinali jinkludu l-kulur tal-ġisem (jiġifieri ċar/skur), il-mudelli ta' kolorazzjoni (jiġifieri l-preżenza jew in-nuqqas ta' faxex vertikali), il-forma tal-ġisem (jiġifieri l-forma tar-ras u tar-reġjun pettorali, id-distensjoni tal-addome), u l-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (jiġifieri l-għadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra, id-daqs tal-kuxxinett dorsali u tal-ovipożitur).

It-tuberkuli tan-namra jinsabu fuq ir-ras (il-kuxxinett dorsali) tal-karpjuni buras irġiel riproduttivament-attivi, u ġeneralment ikunu rranġati f'mudell simmetriku bilateralment (Jensen et al. 2001). In-nisa tal-kontroll u l-irġiel u n-nisa żgħar ma juru l-ebda żvilupp ta' tuberkuli (Jensen et al. 2001). Jista' jkun hemm sa tmien tuberkuli individwali madwar l-għajnejn u bejn l-imnifsejn tal-irġiel. L-akbar għadd ta' tuberkuli u l-akbar tuberkuli jinsabu f'żewġ linji paralleli eżatt taħt l-imnieħer u fuq il-ħalq. F'ħafna ħut hemm gruppi ta' tuberkuli taħt ix-xedaq t'isfel; dawk l-eqreb tal-ħalq ġeneralment jinsabu bħala par uniku, filwaqt li l-iktar sett ventrali jista' jkun magħmul minn massimu ta' erba' tuberkuli. L-għadd attwali ta' tuberkuli rarament ikun ta' aktar minn 30 (medda, 18-28; Jensen et al. 2001). It-tuberkuli predominanti (f'termini ta' għadd) huma preżenti bħala struttura waħda, relattivament tonda, b'għoli kważi ekwivalenti għar-raġġ. Ħafna mill-irġiel attivi fir-riproduzzjoni għandhom ukoll, tal-anqas ftit, tuberkuli mkabbrin u evidenti li m'humiex distingwibbli bħala strutturi individwali.

Xi tipi ta' sustanzi kimiċi li jfixklu s-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' ċerti karatteristiċi sesswali sekondarji fis-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal 17β-metiltestosteron jew 17β-trenbolon, jistgħu jikkawżaw l-iżvilupp ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras nisa (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), filwaqt li agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-għadd jew id-daqs tat-tuberkuli tan-namra fl-irġiel (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Hawn taħt hawn deskrizzjoni tal-karatterizzazzjoni tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras fuq il-bażi ta' proċeduri użati fil-laboratorju tal-Environmental Protection Agency f'Duluth, MN, l-Istati Uniti. Prodotti u/jew tagħmir speċifiċi jistgħu jiġu sostitwiti ma' materjali paragunabbli disponibbli.

L-osservazzjoni ssir l-aħjar bl-użu ta' lenti illuminata jew mikroskopju 3X illuminat għad-dissezzjonijiet. Ħares lejn il-ħuta mil-lat dorsali u anterjuri 'l quddiem (ir-ras lejn min ikun qed josserva).

a) Poġġi l-ħuta f'dixx Petri żgħir (eż., b'dijametru ta' 100 mm), anterjuri 'l quddiem, u ventrali 'l isfel. Iffoka l-*viewfinder* biex tippermetti l-identifikazzjoni tat-tuberkuli. Bil-galbu u bil-mod dawwar il-ħuta minn naħa għall-oħra biex tidentifika ż-żoni fejn ikun hemm it-tuberkuli. Għodd u kklassifika t-tuberkuli.

b) Irrepeti l-osservazzjoni fuq il-lat ventrali tar-ras billi tpoġġi l-lat anterjuri dorsali tal-ħuta 'l quddiem fid-dixx Petri.

c) L-osservazzjonijiet għandhom jitlestew fi żmien 2 minuti għal kull ħuta.

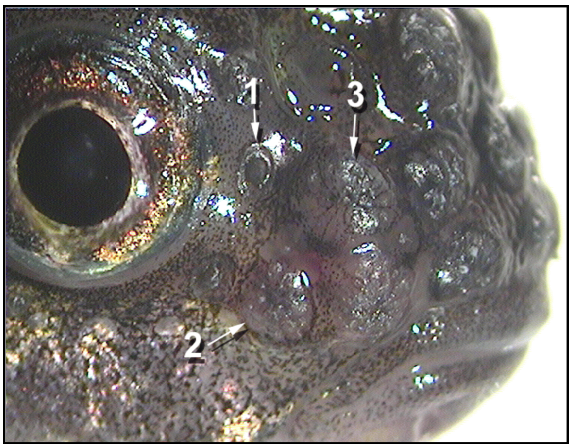
▼M6

L-Għadd u l-Klassifikazzjoni tat-Tuberkuli

Ġew identifikati sitt żoni speċifiċi għall-valutazzjoni tal-preżenza u tal-iżvilupp tat-tuberkuli f'karpjuni buras adulti. Ġie żviluppat mudell biex jiġi mmappjat il-post u l-kwantità tat-tuberkuli preżenti (ara tmiem dan l-Appendiċi). L-għadd ta' tuberkuli jiġi rreġistrat u d-daqs tagħhom jista' jiġi kklassifikat b'mod kwantitattiv bħala: 0- xejn, 1-preżenti, 2-imkabbrin u 3-evidenti għal kull organiżmu (Fig. 1).

Klassifikazzjoni ta' 0- ebda tuberkulu preżenti. Klassifikazzjoni ta' 1-preżenti, hija identifikata bħala kwalunkwe tuberkulu li jkollu punt uniku li l-għoli tiegħu ikun kważi ekwivalenti għar-raġġ tiegħu (dijametru). Klassifikazzjoni ta' 2- mkabbrin, hija identifikata bħala tessut li fid-dehra jixbah asterisk, li ġeneralment ikollu bażi radjali kbira bi xquq jew kanali ħerġin miċ-ċentru. Ħafna drabi l-għoli tat-tuberkuli ikun aktar ippizzjat iżda xi drabi jista' jkun naqra fit-tond. Klassifikazzjoni ta' 3- evidenti, ġeneralment ikun pjuttost kbir u ttundjat bi struttura inqas definita. Xi drabi dawn it-tuberkuli ikunu qrib xulxin u jiffurmaw massa waħda tul żona individwali jew taħlita ta' żoni (B, C u D, deskritti hawn taħt). Il-kolorazzjoni u d-disinn huma simili għall-klassifikazzjoni ta' 2 iżda xi drabi ikunu pjuttost indiskriminati. Ġeneralment l-użu ta' din is-sistema ta' klassifikazzjoni jwassal għal punteġġi globali ta' tuberkuli ta' < 50 f'raġel normali tal-kontroll b'għadd ta' 18 sa 20 tuberkulu (Jensen et al. 2001

Figura 1



F'ċertu ħut l-għadd propju ta' tuberkuli jista' jkun akbar mill-kaxxi tal-mudelli (Appendiċi A) għal żona partikolari ta' klassifikazzjoni. F'dan il-każ, in-numri addizzjonali ta' klassifikazzjoni jistgħu jiġu mmarkati ġewwa, fuq il-lemin jew fuq ix-xellug tal-kaxxa. Għalhekk, il-mudell m'għandux għalfejn ikun simmetriku. Teknika addizzjonali għall-immappjar tat-tuberkuli f'pari jew mehmużin vertikalment tul il-pjan orizzontali tal-ħalq tista' ssir billi f'kaxxa waħda jitniżżlu żewġ punti ta' klassifikazzjoni tat-tuberkuli.

Reġjuni ta' mmappjar:

A — Tuberkuli li jinsabu madwar l-għajnejn. Jiġu mmappjati mil-lat dorsali għal dak ventrali madwar ir-rimm anterjuri tal-għajn. Komunement dawn ikunu f'multipli f'irġiel maturi ta' kontroll, ma jkunux preżenti f'nisa ta' kontroll, ikunu ġeneralment f'par (wieħed ħdejn kull għajn) jew waħedhom f'nisa esposti għall-androġeni.

B — Tuberkuli li jinsabu bejn l-imnieħer, (pori sensorjali fil-kanal). Normalment dawn ikunu f'pari f'irġiel tal-kontroll f'livelli aktar elevati (2- imkabbrin jew 3-evidenti) ta' żvilupp. Mhux preżenti f'nisa tal-kontroll b'xi okkorrenza u żvilupp f'nisa esposti għall-androġeni.

C — Tuberkuli li jinsabu eżatt wara l-imnieħer, paralleli mal-ħalq. Ġeneralment dawn ikunu mkabbrin jew evidenti f'irġiel maturi tal-kontroll. Preżenti jew imkabbrin f'irġiel anqas żviluppati jew f'nisa ttrattati bl-androġeni.

▼**M6**

D — Tuberkuli li jinsabu paralleli tul il-linja tal-ħalq. Ġeneralment ikklassifikati bħala żviluppati f'irġiel tal-kontroll. Assenti f'nisa tal-kontroll iżda preżenti f'nisa esposti għall-androġeni.

E — Tuberkuli li jinsabu fuq ix-xedaq t'isfel, qrib il-ħalq, normalment ikunu żgħar u ġeneralment ikunu f'pari. Ivarjaw f'irġiel tal-kontroll jew ittrattati, u f'nisa ttrattati.

F — Tuberkuli li jinsabu fil-lat ventrali għal E. Normalment ikunu żgħar u f'pari. Preżenti f'irġiel tal-kontroll u f'nisa esposti għall-androġeni.

REFERENZI

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

Mudell għat-Tuberkuli

ID _____

Data _____

Total _____

Klassifikazzjoni Numerika

1-preżenti

2-mkabbar

3-pronunzjat

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M6

Appendiċi 5B

Valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-medaka għad-detezzjoni ta' ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali

Hawn taħt hawn deskrizzjoni tal-kejl tal-proċessi papillari (*), li huma l-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-medaka (*Oryzias latipes*).

(*) Normalment il-proċessi papillari jidhru biss f'irġiel adulti u jinsabu fuq ix-xewk tal-pinen mit-tieni sas-seba' jew it-tmien waħda jekk wieħed jgħodd min-naħa posterjuri tal-pinna anali (Fig.1 u 2). Madankollu, il-proċessi rarament jidhru fl-ewwel xewka tal-pinna mil-lat posterjuri tal-pinna anali. Dan l-SOP ikopri l-kejl ta' proċessi fuq l-ewwel xewka tal-pinna (l-għadd ta' xewk tal-pinen jirreferi għall-ordni min-naħa posterjuri tal-pinna anali f'dan l-SOP).

(1) Wara l-qtugħ tal-fwied (Appendiċi 6), il-karkassa titqiegħed f'tubu koniku li jkun fih madwar 10 ml ta' 10 % formalina newtrali bbaferjata ('il fuq: ir-ras, 'l isfel: id-denb). Jekk il-gonada titqiegħed f'soluzzjoni oħra li mhix 10 % formalina newtrali bbaferjata, agħmel qatgħa trasversali tul il-karkassa bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus permezz ta' xafra, u ara li ma tagħmilx ħsara lill-gonopori u l-gonada stess (Fig.3). Poġġi n-naħa kranjali tal-ġisem tal-ħuta fis-soluzzjoni fissattiva biex tippreserva l-gonada, u n-naħa tad-denb tal-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata kif deskritta hawn fuq.

(2) Wara li tpoġġi l-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata, aqbad ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali b'pinzetta u itwih għal madwar 30 sekonda biex iżomm il-pinna anali miftuħa. Meta tkun qed taqbad il-pinna anali b'pinzetta, aqbad ftit xewk tal-pinen fir-reġjun anterjuri bil-galbu biex ma tobroxx il-proċessi papillari.

(3) Wara li żżomm il-pinna anali miftuħa għal madwar 30 sekonda, aħżen ġisem il-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata f'temperatura ambjentali sakemm jitkejlu l-proċessi papillari (il-kejl għandu jsir wara ffissar għal mhux anqas minn 24 siegħa).

Kejl

(1) Wara l-iffissar tal-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata għal mill-inqas 24 siegħa, iġbor il-karkassa tal-ħuta mit-tubu koniku u imsaħ il-formalina fuq il-karta tal-filtru (jew b'xugaman tal-karta).

(2) Poġġi l-ħuta bl-addome 'l fuq. Imbagħad aqta' l-pinna anali b'imqass żgħar tad-dissezzjoni bil-galbu (idealment għandek taqta' l-pinna anali b'ammont żgħir ta' pteriġjofora).

(3) Aqbad ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali li tkun inqatgħet b'pinzetta u poġġiha fuq lastra tal-ħġieġ b'diversi qtar tal-ilma. Imbagħad agħtti l-pinna anali b'għatu tal-ħġieġ. Ara li meta tkun qed taqbad il-pinna anali bil-pinzetta ma tobroxx il-proċessi papillari.

(4) Għodd in-numru tal-joint plate bi proċessi papillari permezz ta' kontatur taħt mikroskopju bijoloġiku (mikroskopju wieqaf jew mikroskopju invertit). Il-proċessi papillari jingħarfu meta jkun hemm formazzjoni żgħira ta' proċessi viżibbli fuq in-naħa posterjuri tal-joint plate. Ikteb in-numru tal-patt

▼**M6**

magħqud li jkollu proċessi papillari f'kull xewka tal-pinna fuq il-worksheet (eż. l-ewwel xewka tal-pinna: 0, it-tieni xewka tal-pinna: 10, it-tielet xewka tal-pinna: 12, eċċ.) u daħħal it-total ta' dan in-numru fuq l-spreadsheet tal-Excel għal kull ħuta individwali. Jekk ikun hemm bżonn, ħu ritratt tal-pinna anali u għodd in-numru tal-*joint plate* bi proċessi papillari fuq ir-ritratt.

(5) Wara l-kejl, poġġi l-pinna anali fit-tubu koniku deskritt f'(1) u aħżnu.

Fig.1.

Dijagramma li turi differenza sesswali fil-forma u d-daqs tal-pinna anali. A, raġel; B, mara. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

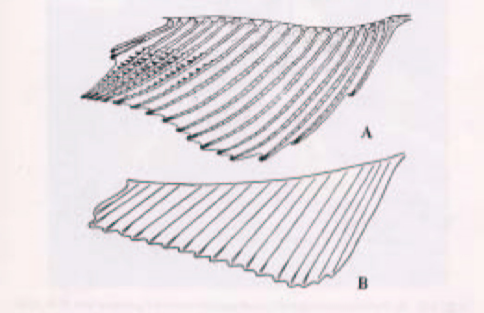
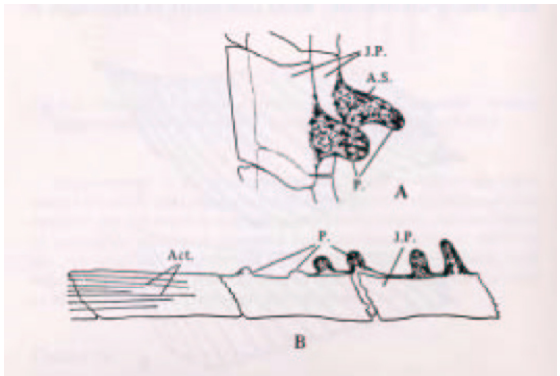


Fig.2.

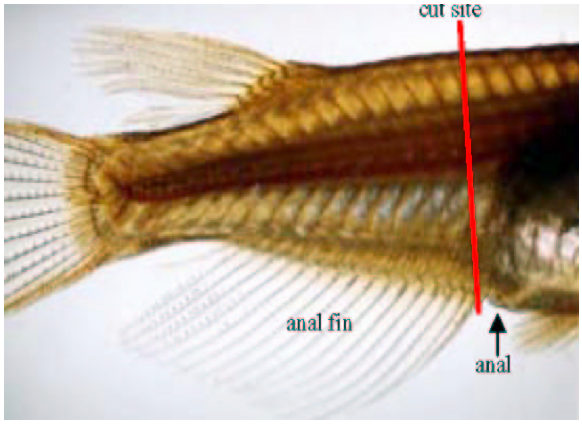
A, Proċessi fuq *joint plates* ta' xewka tal-pinna anali. J.P., *joint plate*; A.S., spazju assjali; P., proċess. B, Estremità distali tax-xewka tal-pinna. L-Aktinotrikiji (Act.) qegħdin fuq il-ponta. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼**M6**

Fig.3.

Ritratt tal-ġisem ta' ħuta li juri l-post tal-qtugħ meta l-gonada tkun iffissata fis-soluzzjoni fissattiva li mhijiex 10 % formalina newtrali bbaferjata. F'dak il-każ, il-ġisem li jifdal jinqata' bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus b'xafra (strixxa ħamra), u l-parti tar-ras tal-ġisem tal-ħuta titqiegħed fis-soluzzjoni fissattiva għall-gonada u l-parti tad-denb ta' ġisem il-ħuta titqiegħed f'10 % formalina newtrali bbaferjata.



▼M6

Appendiċi 6

Proċeduri rakkomandati għall-ġbir ta' kampjuni għall-analiżi tal-vitelloġenina

Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata kontrokontaminazzjoni bejn il-kampjuni tal-VTG tal-irġiel u tan-nisa.

Proċedura 1A: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina/Arterja Kawdali

Wara li tingħata l-anestesija, il-pedunkulu kawdali jinqata' parzjalment b'xafra tal-iskarpell u d-demm jinġabar mill-vina/arterja kawdali b'tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Wara li jinġabar id-demm, il-plażma tiġi iżolata malajr permezz ta' ċentrifugazzjoni għal 3 min f'15 000 g (jew inkella għal 10 min. f'15 000g f'temperatura ta' 4 °C). Jekk ikun mixtieq, il-persentaġġ tal-ematokrit jista' jiġi determinat wara ċ-ċentrifugazzjoni. Imbagħad il-porzjon tal-plażma jitneħħa mit-tubu mikroematokritiku u jinħażen ġo tubu ċentrifugu b'0,13-il unità ta' aprotinin (inibitur tal-proteażi) f'temperatura ta' – 80 °C sakemm tista' ssir id-determinazzjoni tal-vitelloġenina. Skont id-daqs tal-karpjun buras (li jiddependi mis-sess), il-volumi tal-plażma li jistgħu jinġabru ġeneralment ivarjaw minn 5 sa 60 mikrolitru għal kull ħuta (Jensen *et al.* 2001).

Proċedura 1B: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Qalb

Inkella d-demm jista' jinġabar ukoll permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa eparinizzata (1 000 unità eparina għal kull ml). Id-demm jiġi ttrasferit f'tubi Eppendorf (miżmuma fuq is-silġ) u mbagħad jiġi ċentrifugat (5 min, 7 000 g, f'temperatura ambjentali). Il-plażma għandha tiġi ttrasferita f'tubi Eppendorf nodfa (f'alikwoti jekk il-volum tal-plażma jippermetti li dan isir) u dlonk tiġi ffriżata f'temperatura ta' – 80 °C, sakemm tiġi analizzata (Panter et al., 1998).

Proċedura 2A: Medaka Ġappuniża, il-Qtugħ tal-Fwied fil-Medaka

It-tneħħija tal-ħuta tat-test mill-kompartiment tat-test

(1) Il-ħut tat-test għandu jitneħħa mill-kompartiment tat-test permezz ta' xibka żgħira f'forma ta' mgħarfa (*spoon-net*). Ara li ma twaqqax il-ħut tat-test fil-kompartimenti l-oħra tat-test.

(2) Fil-prinċipju, il-ħut tat-test għandu jitneħħa fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-ogħla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv. Barra minn hekk, l-irġiel kollha għandhom jitneħħew minn kompartiment wieħed tat-test qabel ma jitneħħew in-nisa li jifdal.

(3) Is-sess ta' kull ħuta tat-test jiġi identifikat abbażi tal-karatteristiċi sesswali sekondarji esterni (eż. il-forma tal-pinna anali).

(4) Poġġi l-ħut tat-test f'reċipjent għat-trasport u ġorru lejn l-istazzjon tax-xogħol għall-qtugħ tal-fwied. Iċċekkja t-tikketti tal-kompartiment tat-test u tar-reċipjent tat-trasport għall-eżattezza u biex tikkonferma li l-għadd ta' ħut li jkun tneħħa mill-kompartiment tat-test u li l-għadd ta' ħut li fadal fil-kompartiment tat-test huma konsistenti ma' dak li huwa mistenni.

(5) Jekk is-sess ma jkunx jista' jiġi identifikat mid-dehra esterna tal-ħuta, neħħi l-ħut kollu mill-kompartiment tat-test. F'dan il-każ, is-sess għandi jiġi identifikat billi jiġu osservati l-gonadi jew il-karatteristiċi sesswali sekondarji taħt mikroskopju sterjoskopiku.

▼**M6**

Qtugħ tal-fwied

(1) Ittrasferixxi l-ħut tat-test mir-reċipjent biex jiġi trasportat lejn is-soluzzjoni anestetika bix-xibka żgħira f'forma ta' mgħarfa.

(2) Wara li l-ħut tat-test ikun ġie anestetizzat, ittrasferixxi l-ħut tat-test fuq karta fitru (jew biċċa tal-karti) b'pinzetta (tip bażiku). Meta tkun qed iżżomm il-ħut tat-test, applika l-pinzetta fuq il-ġnub tar-ras biex tevita milli tikser id-denb.

(3) Imsaħ l-ilma fuq wiċċ il-ħuta tat-test fuq il-karta filtru (jew il-biċċa tal-karti).

(4) Poġġi l-ħut bl-addome 'l fuq. Imbagħad agħmel inċiżjoni trażversali żgħira bejn ir-reġjun ventrali tal-għonq u r-reġjun addominali tan-nofs b'imqass tad-dissezzjoni.

(5) Daħħal l-imqass tad-dissezzjoni fl-inċiżjoni ż-żgħira, u agħmel inċiżjoni fl-addome minn punt kawdali għall-*branchial mantle* għan-naħa kranjali tal-anus tul il-linja tan-nofs tal-addome. Ara li ma daħħalx l-imqass tad-dissezzjoni wisq fil-fond biex tevita milli tagħmel ħsara fil-fwied u l-gonadi.

(6) Wettaq l-operazzjonijiet li ġejjin taħt il-mikroskopju sterjoskopiku.

(7) Poġġi l-ħut tat-test bl-addome 'l fuq fuq il-biċċa tal-karti (dixx Petri tal-ħġieġ jew lastri tal-ħġieġ huma disponibbli wkoll).

(8) Estendi l-ħitan tal-kavità addominali b'pinzetta ta' preċiżjoni u oħroġ l-organi interni fuq barra. Huwa aċċettabbli wkoll li toħroġ l-organi interni fuq barra billi tneħħi naħa waħda tal-ħajt tal-kavità addominali jekk ikun meħtieġ.

(9) Esponi l-parti mqabbda tal-fwied u tal-marrara b'pinzetta oħra ta' preċiżjoni. Imbagħad aqbad il-kanal tal-bili u aqta' l-marrara barra. Ara li ma tiksirx il-marrara.

(10) Aqbad l-esofagu u bl-istess mod aqta' l-passaġġ gastrointestinali minn mal-fwied. Ara li l-kontenut tal-passaġġ gastrointestinali ma jnixxix. Aqta' l-passaġġ gastrointestinali kawdali minn mal-anus u neħħi l-passaġġ mill-kavità addominali.

(11) Ittrimmja l-massa ta' xaħam u t-tessuti l-oħrajn mill-periferija tal-fwied. Ara li ma tobroxx il-fwied.

(12) Aqbad iż-żona portali tal-fwied permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni u neħħi l-fwied mill-kavità addominali.

(13) Poġġi l-fwied fuq il-lastra tal-ħġieġ. Permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni, neħħi kwalunkwe xaħam addizzjonali u tessut estranju (eż., ir-rita addominali), jekk ikun meħtieġ, mill-wiċċ tal-fwied.

(14) Kejjel il-piż tal-fwied b'mikrotubu ta' 1,5 ml bħala tara permezz ta' miżien analitiku elettroniku. Irreġistra l-valur fuq il-worksheet (jinqara: 0,1 mg). Ikkonferma l-informazzjoni ta' identifikazzjoni fuq it-tikketta tal-mikrotubu.

(15) Agħlaq l-għatu tal-mikrotubu li fih il-fwied. Żommu maħżun fi xtilliera għat-tkessiħ (jew fi xtilliera tas-silġ).

(16) Wara l-qtugħ ta' fwied wieħed, naddaf l-istrumenti tad-dissezzjoni jew ibdilhom ma' oħrajn nodfa.

▼**M6**

(17) Neħħi l-fwied mill-ħut kollu fir-reċipjent tat-trasport kif deskritt hawn fuq.

(18) Wara l-qtugħ tal-fwied mill-ħut kollu fir-reċipjent tat-trasport (jiġifieri l-irġiel jew in-nisa kollha f'kompartiment tat-test), poġġi l-kampjuni kollha tal-fwied fi xtilliera għat-tubi b'tikketta għall-identifikazzjoni u aħżinha fil-friża. Meta l-fwied jingħata għal pretrattament ftit wara l-qtugħ, il-kampjuni jittieħdu fl-istazzjon tax-xogħol li jmiss fi xtilliera għat-tkessiħ (jew fi xtilliera tas-silġ).

Wara l-qtugħ tal-fwied, il-karkassa tal-ħuta tkun disponibbli għall-kejl tal-karatteristiċi sesswali sekondarji.

Kampjun

Aħżen il-kampjuni tal-fwied li ttieħdu mill-ħut tat-test f'temperatura ta' ≤ – 70 °C jekk ma jintużawx għall-pretrattament ftit wara l-qtugħ.

Fig-1

Qatgħa eżatt wara l-pinen pettorali bi mqass.

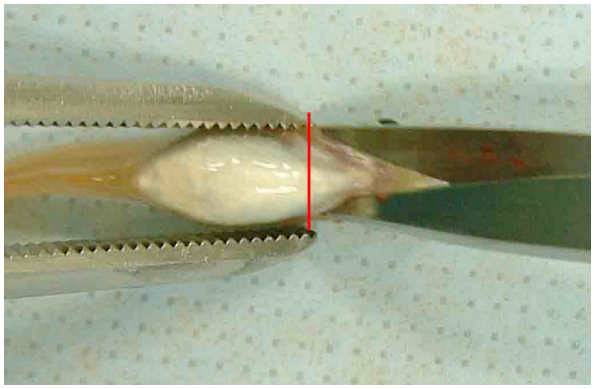
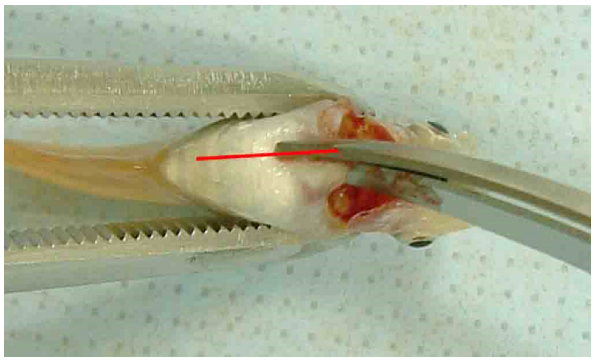


Fig-2

Inċiżjoni fil-linja tan-nofs tal-addome b'imqass sa punt madwar 2 mm kranjali għall-anu.



▼M6

Fig-3

Il-ħitan addominali jinferqu b'forċipi biex jiġi espost il-fwied u organi interni oħra. (Inkella, il-ħitan addominali jistgħu jiġu ppinjati lateralment). Il-vleġġa turi l-fwiedOvarji

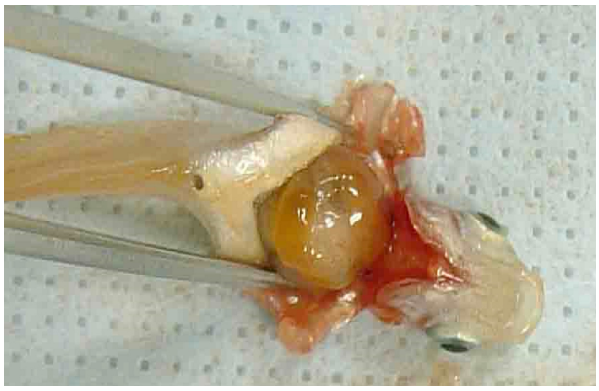


Fig-4

Il-fwied ġie dissezzjonat u jinqata' malajr bil-forċipi.

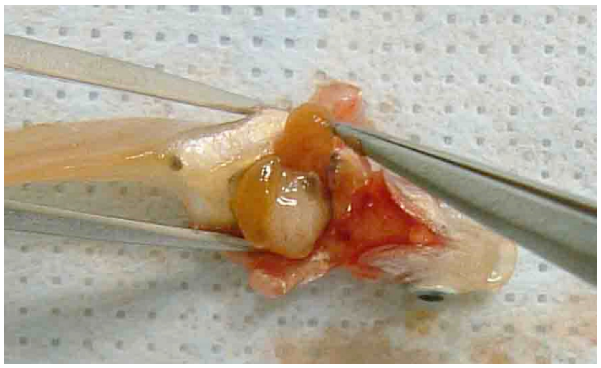


Fig-5

L-intestini jinħarġu bil-galbu permezz tal-forċipi.



▼M6

Fig-6

Iż-żewġ trufijiet tal-intestini u kwalunkwe appendiċi meżenterika jinqatgħu bl-imqass.

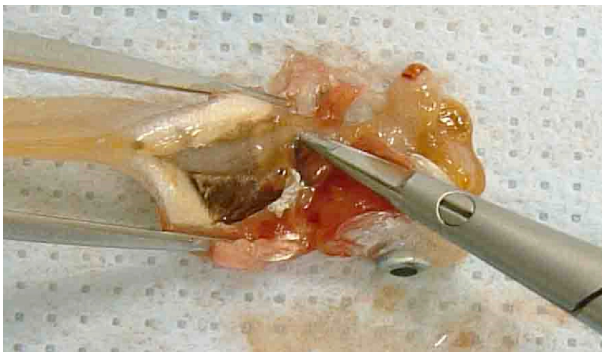


Fig-7 (mara)

Il-proċedura hija identika għall-mara.

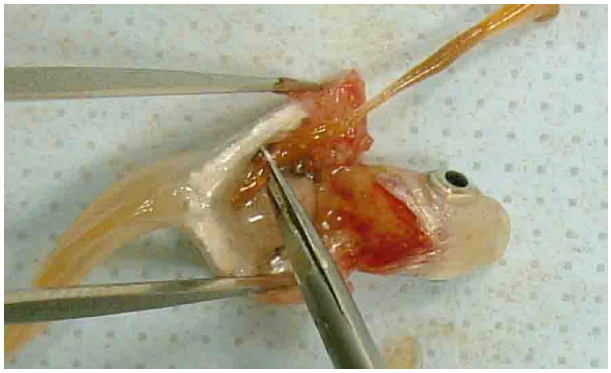
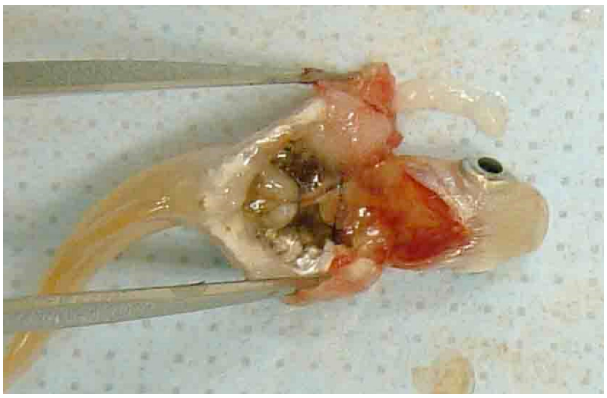


Fig-8

Il-proċedura lesta.



Proċedura 2 B: Medaka Ġappuniża (Oryzias latipes), Pretrattament tal-Fwied għall-Analiżi tal-Vitelloġenina

Ħu l-flixkun tal-bafer omoġenat mill-kitt ELISA u kesħu b'silġ imfarrak (temperatura tas-soluzzjoni: ≤ 4 °C). Jekk ikun qed jintuża bafer omoġenat mis-sistema EnBio ELISA, ħalli s-soluzzjoni toqgħod f'temperatura tal-kamra, u mbagħad kessaħ il-flixkun bis-silġ imfarrak.

▼**M6**

Ikkalkola l-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied fuq il-bażi tal-piż tiegħu (għall-omoġenat żid 50 µl ta' bafer omoġenat għal kull mg tal-piż tal-fwied). Pereżempju, jekk il-piż tal-fwied ikun ta' 4,5 mg, il-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied ikun ta' 225 µl. Ħejji lista tal-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied kollu.

Tħejjija tal-fwied għal pretrattament

(1) Oħroġ il-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied mill-friża eżatt qabel it-trattament minn qabel.

(2) Il-pretrattament tal-fwied mill-irġiel għandu jsir qabel dak tan-nisa biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-vitelloġenina. Barra minn hekk, il-pretrattament għall-gruppi tat-test għandu jsir fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-ogħla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv.

(3) L-għadd ta' mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom kampjuni tal-fwied meħudin mill-friża fi żmien partikolari m'għandux jaqbeż l-għadd li jista' jiġi ċentrifugat dak il-ħin.

(4) Irranġa l-mikrotubi ta' 1,5 ml li fihom il-kampjuni tal-fwied fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq ix-xtilliera tas-silġ (m'hemmx bżonn li l-fwied jinħall).

Operazzjoni tal-pretrattament

1. Żieda tal-bafer omoġenizzanti

(1) Iċċekkja l-lista għall-volum tal-bafer omoġenat li se jintuża għal kampjun partikolari ta' fwied u aġġusta l-mikropipetta (medda tal-volum: 100-1 000 µl) sakemm jintlaħaq il-volum xieraq. Waħħal ponta nadifa mal-mikropipetta.

(2) Ħu l-bafer omoġenat mill-flixkun tar-reaġent u żid il-bafer mal-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied.

(3) Żid il-bafer omoġenat fil-mikrotubi kollha ta' 1,5 ml li jkun fihom il-fwied skont il-proċedura deskritta hawn fuq. M'hemmx bżonn li tibdel il-ponta tal-mikropipetta ma' waħda ġdida. Madanakollu, jekk il-ponta tkun kontaminata jew ikun hemm suspett li tkun kontaminata, il-ponta għandha tinbidel.

2. Omoġenizzazzjoni tal-fwied

(1) Waħħal lida ġdida għall-omoġenizzazzjoni mal-omoġenizzatur tal-mikrotubu.

(2) Daħħal il-lida fil-mikrotubu ta' 1,5 ml. Żomm l-omoġenizzatur tal-mikrotubu biex tagħfas il-fwied bejn il-wiċċ tal-lida u l-ħajt intern tal-mikrotubu ta' 1,5 ml.

(3) Ħaddem l-omoġenizzatur tal-mikrotubu għal 10 sa 20 sekonda. Matul l-operazzjoni kessaħ il-mikrotubu ta' 1,5 ml b'silġ imfarrak.

(4) Neħħi l-lida mill-mikrotubu ta' 1,5 ml u ħalliha tistrieħ għal madwar 10 sekondi. Imbagħad spezzjona viżwalment l-istat tas-sospensjoni.

(5) Jekk tara biċċiet ta' fwied fis-sospensjoni, irrepeti l-operazzjonijiet (3) u (4) biex tħejji omoġenat sodisfaċenti tal-fwied.

▼**M6**

(6) Kessaħ l-omoġenat tal-fwied sospiż fuq l-ixtilliera tas-silġ sakemm issir iċ-ċentrifugazzjoni.

(7) Biddel il-lida ma' waħda ġdida għal kull omoġenat.

(8) Omoġenizza l-fwied kollha bil-bafer omoġenat skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

3. Ċentrifugazzjoni tal-omoġenat tal-fwied sospiż

(1) Ikkonferma li t-temperatura tal-kompartiment taċ-ċentrifugazzjoni imkessaħ tkun ta' ≤ 5 °C.

(2) Daħħal il-mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom l-omoġenat tal-fwied sospiż f'ċentrifuga mkessħa (aġġusta l-bilanċ jekk ikun hemm bżonn).

(3) Iċċentrifuga l-omoġenat tal-fwied sospiż f'13 000 g għal 10 min f'temperatura f'≤ 5 °C. Madankollu, jekk is-supernatanti ikunu ġew separati b'mod adegwat, il-forza ċentrifuga u l-ħin jistgħu jiġu aġġustati skont il-bżonn.

(4) Wara ċ-ċentrifugazzjoni, ara li s-supernatanti jkunu separati b'mod adegwat (saff tal-wiċċ: lipidu, saff intermedju: supernatant, saff tal-qiegħ: tessut tal-fwied). Jekk is-separazzjoni ma tkunx adegwata, erġa' iċċentrifuga s-sospensjoni fl-istess kondizzjonijiet.

(5) Neħħi l-kampjuni kollha miċ-ċentrifugu mkessaħ u rranġahom fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq l-ixtilliera tas-silġ. Ara li ma terġax tissospendi kull saff li jkun ġie sseparat wara ċ-ċentrifugazzjoni.

4. Il-ġbir tas-supernatant

(1) Poġġi erba' mikrotubi ta' 0,5 ml biex fihom taħżen is-supernatant fl-ixtilliera tat-tubi.

(2) Iġbor 30 µl minn kull supernatant (separat bħala s-saff intermedju) bil-mikropipetta u poġġih f'wieħed mill-mikrotubi ta' 0,5 ml. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq is-saff tal-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegħ.

(3) Iġbor is-supernatant u qassmu fiż-żewġ mikrotubi l-oħra ta' 0,5 ml bl-istess mod kif deskritt hawn fuq.

(4) Iġbor il-bqija tas-supernatant bil-mikropipetta (jekk dan ikun jista' jsir: ≥ 100 µl). Imbagħad itfa' s-supernatant fil-mikrotubu ta' 0,5 ml li jifdal. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq il-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegħ.

(5) Agħlaq l-għatu tal-mikrotubu ta' 0,5 ml u ikteb il-volum tas-supernatant fuq it-tikketta. Imbagħad kessaħ minnufih il-mikrotubi fuq l-ixtilliera tas-silġ.

(6) Biddel il-ponta tal-mikropipetta b'waħda ġdida għal kull supernatant. Jekk ikun hemm ammont kbir ta' lipidu mwaħħal mal-ponta, ibdilha ma' waħda ġdida minnufih biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-estratt tal-fwied bix-xaħam.

(7) Qassam is-supernatant ċentrifugat kollu f'erba' mikrotubi ta' 0,5 ml skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

▼M6

(8) Wara li tkun qassamt is-supernatant fil-mikrotubi ta' 0,5 ml, poġġihom kollha fl-ixtilliera tat-tubi bit-tikketta ta' identifikazzjoni, u mbagħad iffriżahom fil-friża minnufih. Jekk il-konċentrazzjonijiet tal-VTG jitkejlu eżatt wara l-pretrattament, żomm mikrotubu wieħed ta' 0,5 ml (li fih 30 µl ta' supernatant) kiesaħ fl-ixtilliera tat-tubi u ttrasferixxih fl-istazzjon tax-xogħol fejn se jsir l-assaġġ ELISA. F'dan il-każ, poġġi l-mikrotubi li fadal fl-ixtillieri tat-tubi u ffriżahom fil-friża.

(9) Wara li tiġbor is-supernatant, armi l-fdalijiet b'mod adegwat.

Ħażna tal-kampjun

Aħżen il-mikrotubi ta' 0,5 ml li jkun fihom is-supernatant tal-omoġenat tal-fwied f'temperatura ta' ≤ – 70 °C sakemm jintużaw għall-ELISA.

Proċedura 3A: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina / Arterja Kawdali

Eżatt wara li tingħata l-anestesija, il-pedunkulu kawdali jinqata' b'mod trażversali, u d-demm jittieħed mill-vina/arterja kawdali permezz ta' tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Il-volumi tad-demm ivarjaw minn 5 sa 15 µl skont id-daqs tal-ħuta. Mat-tubu mikrokapillari jiżdied volum indaqs ta' bafer ta' aprotinin (6 µgml f'PBS), u l-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (5 minuti b'600 g). Il-plażma tinġabar fit-tubi tat-test u tinħażen f'temperatura ta' – 20 °C sakemm tiġi analizzata għall-vitelloġenina jew għal proteini oħrajn ta' interess.

Proċedura 3B: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm permezz ta' Titqiba fil-Qalb

Biex jiġi evitat milli d-demm jikkoagula u l-proteini jiddegradaw, il-kampjuni jinġabru f'bafer ta' salina b'bafer tal-Fosfat (PBS) li jkun fih eparina (1 000 unità/ml) u l-inibitur tal-proteażi aprotinin (2 TIU/ml). Bħala ingredjenti għall-bafer, huma rrakkomandati melħ tal-ammonijaka-eparina, u aprotinin lijofilizzat. Għall-kampjunar tad-demm, hija rrakkomandata siringa (1 ml) b'labra fissa rqiqa (eż. Braun Omnikan-F). Is-siringa għandha timtela minn qabel b'bafer (madwar 100 µl) biex il-volumi żgħar tad-demm minn kull ħuta jitneħħew kompletament. Il-kampjuni tad-demm jittieħdu permezz ta' titqiba fil-qalb. L-ewwel il-ħut għandu jiġi anestetizzat b'MS-222 (100 mg/l). Il-pjan xieraq ta' anestesija jippermetti sabiex l-utent jiddistingwi t-taħbita tal-qalb taż-żebra. Waqt li tkun qed ittaqqab il-qalb, żomm il-pistun tas-siringa taħt pressjoni baxxa. Il-volumi tad-demm li jistgħu jinġabru jvarjaw bejn 20 — 40 mikrolitru. Wara t-titqiba tal-qalb, it-taħlita tad-demm/bafer għandha tintefa' fit-tubu tat-test. Il-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (20 min; 5 000 g) u għandha tinħażen f'temperatura ta' – 80 °C sakemm tkun meħtieġa għall-analiżi.

Proċedura 3Ċ: SOP: Żebra, l-omoġenizzazzjoni tar-ras u d-denb

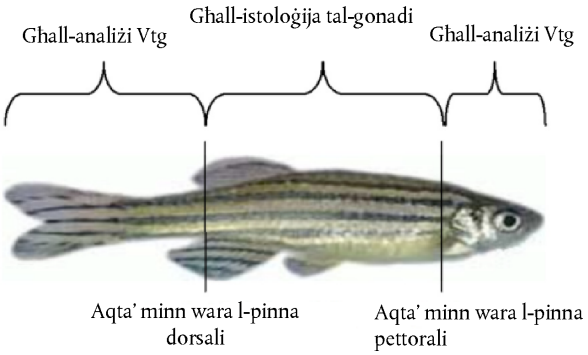
(1) Il-ħut jiġi anestetizzat u ewtanizzat skont id-deskrizzjoni tat-test.

(2) Ir-ras u d-denb jinqatgħu mill-ħuta skont il-Figura 1.

Importanti: L-istrumenti kollha tad-dissezzjoni, u l-injama tat-tqattigħ għandhom jitlaħalħu u jitnaddfu sew (eż. b'96 % etanol) bejn l-immaniġġjar ta' kull ħuta biex jiġi evitat "tniġġis tal-vitelloġenina" minn nisa jew irġiel indotti lil irġiel li ma ġewx indotti.

▼**M6**

Figura 1



(3) Il-piż ikkombinat tar-ras u d-denb minn kull ħuta jitkejjel sal-eqreb mg.

(4) Wara li jintiżnu, il-partijiet jitpoġġew f'tubi adattati (eż. Eppendorf ta' 1,5 ml) u jiġu ffriżati f'– 80 °C sakemm jiġu omoġenizzati jew jiġu omoġenizzati direttament fuq is-silġ b'żewġ pistilli tal-plastik. (Jistgħu jintużaw metodi oħrajn jekk isiru fuq is-silġ u r-riżultat ikun massa omoġena). Importanti: It-tubi għandhom jiġu enumerati sew sabiex ir-ras u d-denb mill-ħuta jkunu jistgħu jiġu relatati mas-sezzjoni tal-ġisem rispettiva tagħhom użata għall-istoloġija gonadali.

(5) Meta tintlaħaq massa omoġena, jiżdied bafer omoġenizzanti (*) kiesaħ silġ li jkun 4 darbiet il-piż tat-tessut. Kompli aħdem bil-pistili sakemm it-taħlita tkun omoġenja. Nota importanti: Għal kull ħuta jintużaw pistili ġodda.

(6) Il-kampjuni jitqiegħdu fuq is-silġ sakemm issir ċentrifugazzjoni f'4 °C b'50 000 × g għal 30 min.

(7) Uża pipetta biex tqassam porzjonijiet ta' 20 µl ta' supernatant f'mill-inqas żewġ tubi billi tgħaddas il-ponta tal-pipetta taħt is-saff tax-xaħam fuq il-wiċċ u tiġbed bil-mod is-supernatant mingħajr frazzjonijiet ta' xaħam jew ta' gerbub.

(8) It-tubi jinħażnu f'– 80 °C sakemm jiġu biex jintużaw.

(*) **Bafer omoġenizzanti:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Koktejl ta' inibituri tal-proteażi (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Koktejl ta' inibituri tal-proteażi.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) eż. minn Bie & Berntsen, id-Danimarka.

— Koktejl ta' inibituri tal-proteażi: Minn Sigma (għal tessut tal-mammiferi) Numru tal-prodott P 8340.

— *Nota:* Il-bafer omoġenizzanti għandu jintuża dakinhar stess meta jiġi manifatturat. Poġġi fuq is-silġ waqt li jkun qed jintuża.

▼**M6**

Appendiċi 7

Kampjuni b'fortifikazzjoni ta' vitelloġenina u standard ta' referenza interassaġġ

F'kull jum li jsiru l-assaġġi tal-vitelloġenina, irid jiġi analizzat kampjun taż-żieda magħmul permezz ta' standard ta' referenza interassaġġ. Il-vitelloġenina użata biex isir l-istandard ta' referenza interassaġġ għandha tkun minn lott differenti minn dak użat għat-tħejjija ta' standards tal-kalibraġġ għall-assaġġ imwettaq.

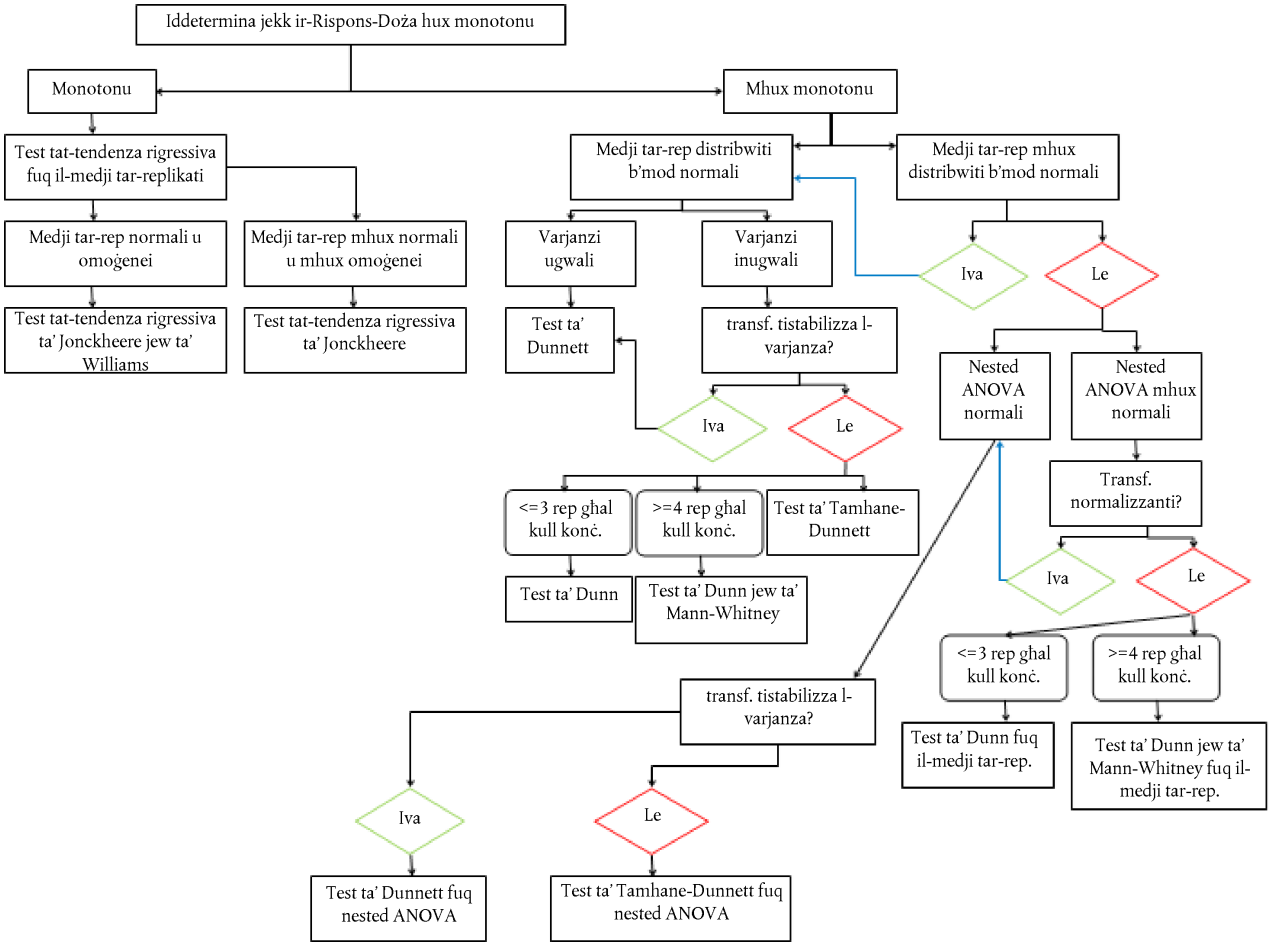
Il-kampjun taż-żieda se jittieħed billi tiżdied kwantità magħrufa tal-istandard interassaġġ ma' kampjun ta' plażma tal-irġiel tal-kontroll. Il-kampjun se jiġi miżjud sabiex tinkiseb konċentrazzjoni tal-vitelloġenina bejn 10 u 100 darba l-konċentrazzjoni mistennija tal-vitelloġenina tal-ħut maskili ta' kontroll. Il-kampjun tal-plażma tal-irġiel tal-kontroll li huwa miżjud jista' jittieħed minn ħuta waħda jew jista' jkun ġej minn diversi ħut.

Sottokampjun tal-plażma tal-irġiel tal-kontroll mhux miżjuda se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ *wells* duplikati. Il-kampjun miżjud se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ *wells* duplikati wkoll. Il-kwantità medja tal vitelloġenina fiż-żewġ kampjuni tal-plażma mhux miżjuda tal-irġiel tal-kontroll tiżdied mal-kwantità kkalkolata tal-vitelloġenina miżjuda maż-żieda tal-kampjuni biex tiġi determinata konċentrazzjoni mistennija. Il-proporzjon ta' din il-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla ser jiġi rrapportat flimkien mar-riżultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

▼M6

Appendiċi 8

Flowchart deċiżjonali għall-analiżi statistika



02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

C.38. L-ASSAĠĠ TAL-METAMORFOSI TAL-AMFIBJI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 231 tal-OECD (2009). Il-ħtieġa ta' żvilupp u validazzjoni ta' assaġġ li kapaċi jidentifika sustanzi kimiċi attivi fis-sistema tat-tirojde ta' speċijiet vertebrati ġejja mit-tħassib fuq il-fatt li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkaġunaw effetti avversi kemm fuq il-bniedem kif ukoll fuq l-organiżmi slavaġ. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi t-TGs eżistenti u tiżviluppa TGs ġodda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' sustanzi potenzjali li jfixklu s-sistema endokrinali. Element tal-attività kien li tiġi żviluppata TG għat-tgħarbil tas-sustanzi kimiċi attivi fis-sistema tat-tirojde ta' speċijiet vertebrati. Ġew proposti kemm tisħiħ tal-Istudju dwar it-tossiċità b'doża orali ripetuta ta' 28 jum (Kapitlu B.7 ta' dan l-Anness) kif ukoll l-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA). Il-metodu ta' ttestjar imsaħħaħ B.7 ġie vvalidat u nħareġ metodu ta' ttestjar rivedut. L-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA) ġie soġġett għal programm estensiv ta' validazzjoni li kien jinkludi studji intra u interlaboratorji li wrew ir-relevanza u l-affidabilità tal-assaġġ (1, 2). Imbagħad, il-validazzjoni tal-assaġġ ġiet soġġetta għal evalwazzjoni bejn il-pari minn panil ta' esperti indipendenti (3). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa r-riżultat tal-esperjenza miksuba matul l-istudji ta' validazzjoni għall-identifikazzjoni tas-sustanzi attivi fit-tirojde, u tal-ħidma mwettqa fi mkejjen oħra f'pajjiżi membri tal-OECD.

PRINĊIPJU TAT-TEST

2. L-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA) huwa assaġġ ta' tgħarbil maħsub sabiex jidentifika b'mod empiriku dawk is-sustanzi kimiċi li jistgħu jfixklu mal-funzjoni normali tal-assi ipotalamiku-pitwitarju-tirojde (HPT). L-AMA jirrappreżenta mudell iġġeneralizzat tal-vertebrati sal-punt li huwa bbażat fuq l-istrutturi u l-funzjonijiet miżmumin tal-assi HPT. Huwa assaġġ importanti għaliex il-metamorfosi tal-amfibji tipprovdi proċess studjat sew li jiddependi fuq it-tirojde li jirrispondi għal sustanzi kimiċi attivi fi ħdan l-assi HPT, u huwa l-uniku assaġġ eżistenti li jidentifika attività fit-tirojde f'annimal li jkun għaddej minn żvilupp morfoloġiku.

3. Id-disinn sperimentali ġenerali jinvolvi l-espożizzjoni ta' mrieżeb *Xenopus laevis* fl-istadju 51 għal minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet differenti ta' sustanza kimika tat-test u kontroll tal-ilma ta' dilwizzjoni għal 21 jum. Hemm erba' rreplikati ta' kull trattament tat-test. Id-densità tal-larva fil-bidu tat-test hija ta' 20 marżebba għal kull tank tat-test għall-gruppi kollha tat-trattament. Il-punti ta' tmiem osservazzjonali huma t-tul tas-sieq ta' wara, it-tul mill-imnieħer sal-anus (SVL), l-istadju ta' żvilupp, il-piż imxarrab, l-istoloġija tat-tirojde, u osservazzjonijiet ta' kuljum tal-mortalità.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Speċijiet tat-Test

4. *Xenopus laevis* hija kkolturata b'rutina f'laboratorji madwar id-dinja u faċli tinkiseb mingħand fornituri kummerċjali. Ir-riproduzzjoni malajr tista' tiġi indotta f'din l-ispeċi tul is-sena billi jintużaw tilqimiet tal-gonadotrofina korjonika umana (hCG) u l-larva li tirriżulta tista' titrabba b'rutina sal-istadji ta' żvilupp magħżulin f'numri kbar biex ikunu jistgħu jintużaw protokolli tat-testijiet speċifiċi għall-istadju. Idealment il-larva użata

▼M6

fl-assaġġ tinġieb minn adulti mrobbijin fl-istess post. Għad li din mhijiex il-proċedura ideali, ħemm l-alternattiva li l-bajd jew l-embriji jistgħu jintbagħtu lil-laboratorju li jagħmel it-test u jitħallew iderru; mhuwiex aċċettabbli li jintbagħtu stadji ta' larva għall-użu fit-test.

Tagħmir u Provvisti

5. It-tagħmir u l-provvisti li ġejjin huma meħtieġa sabiex isir dan l-assaġġ:

a) Sistema ta' espożizzjoni (ara d-deskrizzjoni iktar 'l isfel);

b) Akkwarji tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli (ara d-deskrizzjoni iktar 'l isfel);

c) Tankijiet għat-tgħammir;

d) Apparat għall-kontroll tat-temperatura (eż., ħiters jew berrieda (aġġustabli sa 22° ± 1 °C));

e) Termometru;

f) Mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari;

g) Kamera diġitali b'riżoluzzjoni minima ta' 4 megapixels u mikrofunzjoni;

h) Software għad-diġitizzazzjoni tal-istampi;

i) Dixx petri (eż. 100 × 15 mm) jew kompartiment tal-plastik trasparenti ta' daqs paragunabbli;

j) Miżien analitiku li kapaċi jkejjel sa 3 punti deċimali (mg);

k) Metru tal-ossiġenu dissolt;

l) Metru tal-pH;

m) Metru tal-intensità tad-dawl li kapaċi jkejjel f'unitajiet lux;

n) Għodod u oġġetti tal-ħġieġ mixxelanji tal-laboratorju;

o) Pipetti aġġustabbli (10 sa 5 000 µl) jew pipetti varji ta' daqsijiet ekwivalenti;

p) Sustanza kimika tat-test f'biżżejjed kwantitajiet sabiex isir l-istudju, idealment lott waħda;

q) Strumentizzazzjoni analitika xierqa għas-sustanza kimika tat-test jew servizzi analitiċi kkuntrattati.

Testabilità tas-Sustanza Kimika

6. L-AMA huwa bbażat fuq protokoll ta' espożizzjoni milwiema li bih is-sustanza kimika tat-test tiddaħħal fil-kompartimenti tat-test permezz ta' sistema bi fluss kontinwu. Madankollu, il-metodi bi fluss kontinwu jġibu magħhom restrizzjonijiet fuq it-tipi ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jiġu ttestjati, kif stabbilit mill-karatteristiċi fiżikokimiċi tas-sustanza kimika. Għaldaqstant, qabel ma jintuża dan il-protokoll għandha tinkiseb informazzjoni tax-xenarju bażi dwar is-sustanza kimika li tkun relevanti sabiex tiġi stabbilita t-testabilità, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akwatika ta' Sustanzi u Taħlitiet

▼M6

Diffiċli (4). Il-karatteristiċi li jindikaw li s-sustanza kimika tista' tkun diffiċli li tiġi ttestjata f'sistemi akkwatiċi jinkludu: koeffiċjenti għoljin ta' partizzjoni ottanol/ilma (log K_{ow}), volatilità għolja, suxxettibilità għal idroliżi, u suxxettibilità għal fotoliżi f'kundizzjonijiet ta' dawl tal-laboratorju ambjentali. Sabiex tiġi stabbilita t-testabilità jista' jkun hemm fatturi relevanti oħrajn, li għandhom jiġu stabbiliti fuq bażi ta' każ b'każ. Jekk ma jkunx possibbli li tintuża b'suċċess sistema ta' ttestjar bi fluss kontinwu għas-sustanza kimika, tista' titħaddem sistema ta' tiġdid statiku. Jekk l-ebda sistema ma tkun kapaċi takkomoda s-sustanza kimika tat-test, f'dak il-każ l-għażla predefinita hija li ma tiġix ittestjata billi jintuża dan il-protokoll.

Sistema ta' Espożizzjoni

7. Sistema ta' dilwitur bi fluss kontinwu hija ppreferita, meta tkun possibbli, meta mqabbla ma' sistema ta' tiġdid statiku. Jekk karatteristiċi fiżiċi u/jew kimiċi ta' xi waħda mis-sustanzi kimiċi tat-test ma jkunux adattati għal sistema ta' dilwitur bi fluss kontinwu, f'dak il-każ tista' tintuża sistema ta' espożizzjoni alternattiva (eż., b'tiġdid statiku). Il-komponenti tas-sistema għandu jkollhom komponenti li jmissu mal-ilma tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli u/jew tal-Politetrafluworoetilen. Madankollu, jistgħu jintużaw materjali xierqa tal-plastik jekk ma jkunux ta' xkiel għall-istudju. It-tankijiet ta' espożizzjoni għandhom ikunu akkwarji tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli mgħammrin b'pajpijiet wiqfin li jirriżultaw f'volum tat-tank ta' bejn 4,0 u 10,0 l u fond minimu tal-ilma ta' bejn 10 u 15-il cm. Is-sistema għandha tkun tiflaħ għall-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni kollha u kontroll, b'erba' rreplikati għal kull trattament. Ir-rata tal-fluss għal kull tank għandha tkun kostanti wara li jingħata kont kemm liż-żamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll lill-espożizzjoni kimika (eż. 25 ml/min). It-tankijiet tat-trattament għandhom jiġu assenjati għal għarrieda għal pożizzjoni fis-sistema ta' espożizzjoni sabiex jitnaqqsu l-effetti pożizzjonali potenzjali, inklużi ċaqliqiet żgħar fit-temperatura, l-intensità tad-dawl, eċċ. Għandu jintuża dawl fluworexxenti sabiex jiġi pprovut fotoperjodu ta' 12-il siegħa dawl: 12-il siegħa dlam b'intensità li tvarja bejn 600 u 2 000 lux (lumen/m^2) f'wiċċ l-ilma. It-temperatura tal-ilma għandha tinżamm fi 22° ± 1 °C, il-pH tinżamm bejn 6,5 u 8,5, u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % tas-saturazzjoni tal-arja) f'kull tank tat-test. Tal-inqas, it-temperatura tal-ilma, il-pH u l-ossiġenu dissolt għandhom jitkejlu darba fil-ġimgħa; idealment it-temperatura titkejjel b'mod kontinwu f'tal-inqas reċipjent wieħed tat-test. L-Appendiċi 1 jispjega l-kundizzjonijiet sperimentali li fihom għandu jiġi eżegwit il-protokoll. Għal iktar informazzjoni dwar kif jiġu stabbiliti sistemi ta' espożizzjoni bi fluss kontinwu u/jew sistemi ta' tiġdid statiku, jekk jogħġbok irreferi għall-Gwida Standard tal-ASTM għat-Twettiq ta' Testijiet tat-Tossiċità Akuta fuq Materjali tat-Test b'Ħut, Makroinvertebrati, u Amfibji (5) u testijiet tat-tossokoloġija akkwatika ġenerali.

Kwalità tal-ilma

8. Jista' jintuża kwalunkwe ilma li huwa disponibbli lokalment (eż. ilma tannixxiegħa jew ilma tal-vit iffiltrat għall-karbonju) u li jippermetti tkabbir u żvilupp normali tal-imrieżeb. Peress li l-kwalità tal-ilma lokali tista' tvarja b'mod sostanzjali bejn żona u oħra, għandha tiġi analizzata l-kwalità tal-ilma, b'mod partikolari jekk ma jkunx hemm disponibbli dejta storika dwar l-użu tal-ilma għat-trobbija ta' *Xenopus*. Għandha tingħata attenzjoni speċjali għall-fatt li l-ilma jkun ħieles minn ram, kloru u kloramini, li kollha huma tossiċi għal żringijiet u mrieżeb. Huwa rrakkomandat ukoll li jiġi analizzat l-ilma fid-dawl tal-livelli ta' sfond ta' fluworur, perkolat u klorat

▼M6

(prodotti sekondarji tad-diżinfezzjoni tal-ilma tajjeb għax-xorb) peress li dawn l-anjoni kollha huma substrati tat-trasportatur tal-jodju tal-glandola tat-tirojde u livelli għoljin ta' kull wieħed minn dawn l-anjoni jista' jfixkel l-eżitu tal-istudju. Għandha ssir analiżi qabel ma jibdew it-testijiet u, normalment, l-ilma tat-testijiet għandu jkun ħieles minn dawn l-anjoni.

Konċentrazzjoni ta' Jodur fl-Ilma tat-Test

9. Sabiex il-glandola tat-tirojde tissintetizza t-TH, irid jitqiegħed għad-dispożizzjoni biżżejjed jodur għal-larva permezz ta' taħlita ta' sorsi milwiema u djetetiċi. Bħalissa, ma hemm ebda linja gwida derivata b'mod empiriku għal konċentrazzjonijiet minimi ta' jodur. Madankollu, id-disponibilità tal-jodur tista' taffettwa r-risponsività tas-sistema tat-tirojde għal aġenti attivi fit-tirojde u hija magħrufa li timmodula l-attività tal-bażi tal-glandola tat-tirojde, aspett li jistħoqqlu attenzjoni meta jiġu interpretati r-riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde. Għaldaqstant, għandhom jiġu rrapportati l-konċentrazzjonijiet tal-jodur milwiema mkejlin mill-ilma tat-test. Fuq il-bażi tad-dejta disponibbli mill-istudji ta' validazzjoni, intwera li l-protokoll jaħdem sew meta l-konċentrazzjonijiet tal-jodur tal-ilma tat-test (I^-) varjaw bejn 0,5 u 10 µg/l. Idealment, il-konċentrazzjoni minima tal-jodur fl-ilma tat-test għandha tkun ta' 0,5 µg/l. Jekk l-ilma tat-test jiġi rikostitwit minn ilma dejonizzat, il-jodju għandu jiżdied b'konċentrazzjoni minima ta' 0,5 µg/l. Kwalunkwe suppliment addizzjonali tal-ilma tat-test bil-jodju jew melħiet oħrajn għandu jitniżżel fir-rapport.

Żamma tal-annimali

Tgħammir u Indukrar tal-Adulti

10. It-tgħammir u l-indukrar tal-adulti jsiru skont il-linji gwida standard u huwa ssuġġerit li l-qarrej jaqra l-gwida standard għat-twettiq tal-Assaġġ tat-Teratoġenesi tal-Embriji taż-Żrinġijiet (FETAX) (6) għal iktar informazzjoni ddettaljata. It-tali linji gwida standard jipprovdu eżempju ta' metodi xierqa ta' indukrar u tgħammir, iżda ma hemmx bżonn ta' aderenza stretta. Biex jiġi pprovokat it-tgħammir, pari (3-5) ta' nisa adulti u rġiel jiġu injettati b'gonadotrofina korjonika umana (hCG). L-eżemplari nisa u rġiel huma injettati b'madwar 800 IU-1 000 IU u 600 IU-800 IU, rispettivament, ta' hCG dissolta f'soluzzjoni salmastra ta' 0,6-0,9 % Il-pari għat-tgħammir jinżammu f'tankijiet kbar, mhux disturbati u f'kundizzjonijiet statiċi sabiex tiġi promossa l-amplessi. Il-qiegħ ta' kull tank tat-tgħammir għandu jkollu qiegħ falz ta' xibka tal-azzar inossidabbli jew tal-plastik li jippermetti sabiex il-mases tal-bajd jaqgħu f'qiegħ it-tank. Iż-żrinġijiet injettati iktar tard waranofsinhar normalment jiddepożitaw ħafna mill-bajd tagħhom sa nofs il-għodwa tal-għada. Wara li tinħeles u tiġu ffertilizzata kwantità suffiċjenti ta' bajd, l-adulti għandhom jitneħħew mit-tankijiet tat-tgħammir.

Indukrar u Għażla tal-Larva

11. Wara li l-adulti jitneħħew mit-tankijiet tat-tgħammir, il-bajd jinġabar u jiġi evalwat għall-vijabbiltà billi jintuża subsett rappreżentattiv tal-embriji mit-tankijiet kollha tat-tgħammir. L-aħjar bajd individwali tal-ħut (irrakkomandati 2-3 biex tiġi evalwata l-kwalità tal-bajd tal-ħut) għandu jinżamm fuq il-bażi tal-vijabbiltà tal-embriji u l-preżenza ta' numru adegwat (tal-inqas 1 500) ta' embriji. L-organiżmi kollha użati fi studju għandhom ikunu ġejjin minn avveniment ta' riproduzzjoni wieħed (jiġifieri l-bajd ma għandux ikun komħallat). L-embriji huma ttrasferiti f'dixx jew taġen ċatt kbir u l-bajd ovvju mejjet jew anormali (ara d-definizzjoni f'(5)) jitneħħa bl-użu ta' pipetta jew kontagoċċi. L-embriji b'saħħithom minn kull wieħed minn dawn l-avvenimenti ta' riproduzzjoni jiġu ttrasferiti fi tliet tankijiet

▼**M6**

separati għat-tifqis. Erbat ijiem wara li jitqiegħed fit-tankijiet għat-tifqis, jingħażel l-aħjar bajd, fuq il-bażi tal-vijabilità u s-suċċess tat-tifqis, u l-larva tiġi ttrasferita f'numru xieraq ta' tankijiet tat-trobbija fi 22° ± 1 °C. Barra minn hekk, ċerta larva addizzjonali titqiegħed f'tankijiet żejda sabiex tintuża bħala sostituta f'każ li jmutu wħud fit-tankijiet tat-trobbija matul l-ewwel ġimgħa. Din il-proċedura żżomm densità konsistenti tal-organiżmi u b'hekk tnaqqas id-diverġenza fl-iżvilupp fi ħdan il-koorta ta' avveniment wieħed ta' riproduzzjoni. It-tankijiet kollha tat-trobbija għandhom jitbattlu u jitnaddfu kuljum. Bħala prekawzjoni, huma ppreferuti ngwanti tal-vinil jew tan-nitril u mhux ingwanti tal-latex. Il-mortalitajiet għandhom jitneħħew ta' kuljum u għandha tiżdied il-larva ta' sostituzzjoni sabiex tinżamm id-densità tal-organiżmi matul l-ewwel ġimgħa. It-tmigħ għandu jsir tal-inqas darbtejn kuljum.

12. Matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni, l-imrieżeb iderru fil-kundizzjonijiet tal-fażi propja ta' espożizzjoni, inklużi t-tip ta' ikel, it-temperatura, iċ-ċiklu ta' dawl-dlam u l-midjum għall-koltura. Għaldaqstant, huwa rrakkomandat li jintuża l-istess ilma tal-koltura/dilwizzjoni matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni u l-fażi ta' espożizzjoni. Jekk tintuża sistema ta' koltura statika għaż-żamma tal-imrieżeb matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni, il-midjum għall-koltura għandu jitbiddel kompletament tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa. Iffullar, ikkaġunat minn densitajiet għoljin ta' larva matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni, għandu jiġi evitat għaliex it-tali effetti jistgħu jaffetwaw mhux ftit l-iżvilupp tal-imrieżeb matul il-fażi sussegwenti ta' ttestjar. Għaldaqstant, id-densità tat-trobbija ma għandhiex taqbeż bejn wieħed u ieħor l-erba' mrieżeb/l midjum għall-koltura (sistema ta' espożizzjoni statika) jew l-10 imrieżeb/l midjum għall-koltura (b'eż. rata ta' fluss ta' 50 ml/min fis-sistema ta' qabel l-espożizzjoni jew tal-koltura). F'dawn il-kundizzjonijiet, l-imrieżeb għandhom jiżviluppaw mill-istadji 45/46 sal-istadju 51 fi żmien tnax-il jum. L-imrieżeb rappreżentattivi ta' din il-popolazzjoni tal-istokkijiet għandhom jiġu spezzjonati kuljum għall-istadju ta' żvilupp sabiex jiġi stmat il-punt ta' żmien xieraq għall-bidu tal-espożizzjoni. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġu mminimizzati l-istress u t-trawma għall-imrieżeb, speċjalment matul iċ-ċaqliq, it-tindif tal-akkwarji, u l-manipolazzjoni tal-larva. Għandhom jiġu evitati kundizzjonijiet/attivitajiet ta' stress bħal ħsejjes storbjuži u/jew bla heda, taptip fuq l-akkwarji, vibrazzjonijiet fl-akkwarji, attività żejda fil-laboratorju, u bidliet rapidi fil-midjums ambjentali (disponibilità ta' dawl, temperatura, pH, DO, rati tal-fluss tal-ilma, eċċ.) Jekk l-imrieżeb ma jiżviluppawx sal-istadju 51 fi żmien 17-il jum wara l-fertilizzazzjoni, stress eċċessiv għandu jitqies bħala kaġuni potenzjali.

Koltura u Tmigħ tal-Larva

13. L-imrieżeb jintemgħu, pereżempju, b'għalf kummerċjali għall-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni (ara l-appendiċi 1 ukoll) matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni (wara l-istadju 45/46 ta' Nieuwkoop u Faber (NF) (8)) u matul il-perjodu sħiħ tat-test ta' 21 jum, jew dieta oħra li wriet li tilħaq prestazzjoni ekwivalenti bħall-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji. Ir-reġim tat-tmigħ matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni għandu jiġi aġġustat bir-reqqa biex jissodisfa l-ħtiġijiet tal-imrieżeb li qed jiżviluppaw. Jiġifieri, għandhom jiġu pprovduti porzjonijiet żgħar ta' ikel lill-imrieżeb li faqqsu bosta drabi kuljum (tal-inqas darbtejn). Ikel żejjed għandu jiġi evitat sabiex *i)* tinżamm il-kwalità tal-ilma u *ii)* jiġi evitat milli jinstaddu l-filtri tal-garġi b'partikoli u frak tal-ikel. Għall-għalf tal-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni, il-porzjonijiet tal-ikel ta' kuljum

▼M6

għandhom jiżdiedu flimkien mat-tkabbir tal-imrieżeb għal madwar 30 mg/annimali/jum ftit qabel jinbeda t-test. Fl-istudji ta' validazzjoni ntwera li dan l-għalf kummerċjalment disponibbli jsostni t-tkabbir u l-iżvilupp xierqa ta' mrieżeb *X. laevis*, u huwa magħmul minn partikoli fini li jibqgħu sospiżi fil-kolonna tal-ilma għal perjodu twil ta' żmien u huwa soġġett li joħroġ mal-fluss. Għaldaqstant, l-ammont totali ta' ikel ta' kuljum għandu jinqasam f'porzjonijiet żgħar u jingħata tal-inqas darbtejn kuljum. Għal dan it-tmigħ, ir-reġim tat-tmigħ huwa spjegat fit-Tabella 1. Ir-rati tat-tmigħ għandhom jiġu rreġistrati. Jista' jintema' xott jew bħala soluzzjoni ewlenija mħejjija f'ilma ta' dilwizzjoni. Soluzzjoni ewlenija bħal din għandha titħejja ġdida kull jumejn u tinħażen f'4 °C meta ma tintużax.

Tabella 1.

Ir-reġim tat-tmigħ b'għalf kummerċjali għall-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni għal imrieżeb *X. laevis* matul il-porzjon tul il-ħajja tal-AMA f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu

Jum tal-Istudju	Proporzjon tal-ikel (mg għalf/annimal/jum)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Kimika Analitika

14. Qabel ma jsir studju, għandha tiġi evalwata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test billi tintuża l-informazzjoni eżistenti dwar is-solubilità, id-degradabilità u l-volatilità tagħha. Is-soluzzjonijiet tat-test minn kull tank irreplikat f'kull konċentrazzjoni għandhom jiġu kampjunati għal analiżijiet kimiċi analitiċi fil-bidu tat-test (jum 0), u kull ġimgħa matul it-test għal tal-inqas erba' kampjuni. Huwa rrakkomandat ukoll li kull konċentrazzjoni tat-test tiġi analizzata matul it-tħejjija tas-sistema, qabel jibda t-test, sabiex tiġi vverifikata l-prestazzjoni tas-sistema. Barra minn hekk, huwa rrakkomandat li s-soluzzjonijiet ewlenin jiġu analizzati meta jinbidlu, speċjalment jekk il-volum tas-soluzzjoni ewlenija ma jipprovdix ammonti adegwati tas-sustanza kimika biex iservu għad-durata tal-perjodi ta' kampjunar ta' rutina. Fil-każ ta' sustanzi kimiċi li ma jistgħux jiġu identifikati f'uħud mill-konċentrazzjonijiet użati f'test jew f'kollha kemm huma, is-soluzzjonijiet ewlenin għandhom jitkejlu u r-rati tal-fluss tas-sistema għandhom jiġu rreġistrati sabiex jiġu kkalkolati l-konċentrazzjonijiet nominali.

Twassil tas-Sustanza Kimika

15. Il-metodu użat biex is-sustanza kimika tat-test tiddaħħal fis-sistema jista' jvarja skont il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha. Sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jistgħu jiġu dissolti f'alikwoti tal-ilma tat-test f'konċentrazzjoni li tippermetti t-twassil bil-konċentrazzjoni tat-test fil-mira f'sistema bi fluss kontinwu. Sustanzi kimiċi li huma likwidi f'temperatura ambjentali u ftit li xejn jinħallu fl-ilma jistgħu jiddaħħlu bl-użu ta' likwidu: metodi ta' saturatur tal-likwidi. Sustanzi kimiċi li huma solidi f'temperatura ambjentali u li ftit li xejn jinħallu fl-ilma jistgħu jiddaħħlu bl-użu ta' saturaturi tal-kolonna tal-ħġieġ f'forma ta' fibri (7). Idealment tintuża sistema tat-test mingħajr trasportatur, iżda sustanzi kimiċi tat-test differenti ser ikollhom karatteristiċi fiżikokimiċi diversi li aktarx ser ikunu jeħtieġu approċċi differenti għat-tħejjija ta' ilma ta' espożizzjoni kimika. Aħjar isir sforz sabiex

▼M6

jiġu evitati solventi jew trasportaturi għaliex: *i)* ċerti solventi nfushom jistgħu jirriżultaw f'tossiċità u/jew risponsi endokrinoloġiċi mhux mistennija jew mhux mixtieqa, *ii)* l-ittestjar tas-sustanzi kimiċi 'il fuq mis-solubilità tal-ilma tagħhom (kif spiss jista' jseħħ meta jintużaw solventi) jista' jirriżulta f'determinazzjonijiet impreċiżi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, u *iii)* l-użu ta' solventi f'testijiet iktar fit-tul jista' jirriżulta fi grad importanti ta' "biofilming" assoċjat ma' attività mikrobika. Għal sustanzi kimiċi li diffiċili tittestjahom, jista' jintuża solvent bħala l-aħħar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akkwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċili (4) sabiex jiġi stabbilit l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent ser tiġi stabbilita mill-karatteristiċi kimiċi tas-sustanza kimika. Solventi li nstab li huma effettivi għall-ittestjar tat-tossiċità akkwatika inkluż l-aċetun, l-etanol, il-metanol, id-dimetilformamid u t-trietilen glikol. Jekk jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet tas-solvent għandhom ikunu inqas mill-Konċentrazzjoni Mingħajr Effetti Osservabbli (NOEC) kronika; id-Dokument ta' Gwida tal-OECD jirrakkomanda massimu ta' 100 µl/l; reviżjoni riċenti tirrakkomanda li jintużaw konċentrazzjonijiet tas-solvent li jinżlu sa 20µl/l ilma ta' dilwizzjoni (12). Jekk jintużaw trasportaturi tas-solvent, għandhom jiġu evalwati kontrolli xierqa tas-solvent minbarra kontrolli mhux tas-solvent (ilma nadif). Jekk mhuwiex possibbli li sustanza kimika tiddaħħal bl-ilma, jew minħabba l-karatteristiċi fiżikokimiċi (solubilità baxxa) jew id-disponibilità kimika limitata, jista' jiġi kkunsidrat li tiġi introdotta mal-ikel. Saret ħidma preliminari fuq espożizzjonijiet djetetiċi; madankollu, din ir-rotta ta' espożizzjoni ma tintużax spiss. L-għażla tal-metodu għandha tiġi ddokumentata u vverifikata b'mod analitiku.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

Stabbiliment tal-Konċentrazzjoni Għolja tat-Test

16. Għall-finijiet ta' dan it-test, il-konċentrazzjoni għolja tat-test għandha tiġi stabbilita permezz tal-limitu tas-solubilità tas-sustanza kimika tat-test; il-konċentrazzjoni massima ttollerata (MTC) għal sustanzi kimiċi b'tossiċità akuta; jew 100 mg/l, liema minnhom ikun l-inqas.

17. L-MTC hija ddefinita bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test tas-sustanza kimika li tirriżulta f'mortalità akuta ta' inqas minn 10 %. L-użu ta' dan l-approċċ jassumi li hemm dejta empirika eżistenti dwar il-mortalità akuta li minnha tista' tiġi stmata l-MTC. L-istima tal-MTC jaf ma tkunx preċiża u normalment teħtieġ ċertu ġudizzju professjonali. Għad li l-użu ta' mudelli ta' rigressjoni jista' jkun l-iktar approċċ teknikament validu sabiex tiġi stmata l-MTC, approssimazzjoni siewja tal-MTC tista' tinkiseb mid-dejta akuta eżistenti billi jintuża terz mill-valur tal-LC_{50} akuta. Madankollu, id-dejta dwar it-tossiċità akuta tista' tkun nieqsa għall-ispeċijiet tat-test. Jekk ma jkunx hemm dejta dwar it-tossiċità akuta speċifika għall-ispeċi disponibbli, jista' jsir test tal-LC_{50} fuq 96 siegħa b'imrieżeb li jirrappreżentaw (jiġifieri li huma fl-istess stadju) lil dawk tat-test fl-AMA. Jekk hemm dejta minn speċijiet akkwatiċi oħrajn disponibbli (eż. studji tal-LC_{50} f'ħut jew speċijiet amfibji oħrajn), huwa possibbli li jintuża ġudizzju professjonali sabiex tiġi stmata MTC probabbli fuq il-bażi ta' estrapolazzjoni bejn l-ispeċijiet.

18. Inkella, jekk is-sustanza kimika ma tkunx jkollhiex tossiċità akuta u tkun tinħall f'iktar minn 100 mg/l, f'dak il-każ il-100 mg/l għandha titqies l-ogħla konċentrazzjoni tat-test (HTC), peress li din il-konċentrazzjoni tipikament titqies "prattikament mhux tossika."

▼**M6**

19. Għad li mhumiex il-proċedura rrakkomandata, jistgħu jintużaw metodi ta' tiġdid statiku meta l-metodu ta' fluss kontinwu ma jkunux adegwati biex jiksbu l-MTC. Jekk jintużaw metodi ta' tiġdid statiku, f'dak il-każ l-istabbiltà tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi ddokumentata u tibqa' fi ħdan il-limiti tal-kriterji tal-prestazzjoni. Huma rrakkomandati perjodi ta' tiġdid kull erbgħa u għoxrin siegħa. Perjodi ta' tiġdid li jaqbżu t-72 siegħa mhumiex aċċettabbli. Barra minn hekk, il-parametri tal-kwalità tal-ilma (eż. id-DO, it-temperatura, il-pH, eċċ.) għandhom jitkelju fi tmiem kull perjodu ta' tiġdid, eżatt qabel it-tiġdid.

Medda tal-Konċentrazzjoni tat-Test

20. Hemm *minimu* meħtieġ ta' tliet konċentrazzjonijiet tat-test u kontroll tal-ilma nadif (u kontroll tal-veikolu jekk hemm bżonn). Id-differenzjali minima tal-konċentrazzjoni tat-test bejn l-ogħla u l-inqas għandha tkun ta' madwar ordni ta' kobor wieħed. Is-separazzjoni tad-doża massima hija ta' 0,1 u l-minimu huwa 0,33.

PROĊEDURA

Bidu u Twettiq tat-Test

Jum 0

21. L-espożizzjoni għandha tinbeda meta jkun hemm numru biżżejjed ta' mrieżeb fil-popolazzjoni tal-istokk ta' qabel l-espożizzjoni li laħqu l-istadju 51 tal-iżvilupp, skont Nieuwkoop and Faber (8), u li għandhom età ta' 17-il jum jew inqas wara l-fertilizzazzjoni. Għall-għażla tal-annimali tat-test, imrieżeb b'saħħithom u normali mill-popolazzjoni tal-istokk għandhom jingabru f'reċipjent wieħed li fih volum xieraq ta' ilma ta' dilwizzjoni. Sabiex jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp, l-imrieżeb għandhom jitneħħew wieħed, wieħed mit-tank tar-raggruppament billi jintużaw xibka żgħira jew passatur u jiġu ttrasferiti f'kompartiment tal-kejl trasparentI (eż. dixx Petri ta' 100 mm) li fih ilma ta' dilwizzjoni. Sabiex jiġi stabbilit l-istadju, idealment ma tintużax anestezija, iżda l-imrieżeb jistgħu jiġu anestetizzati wieħed, wieħed bl-użu ta' 100 mg/l trikaina metansulfonat (eż. MS-222), ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju (pH 7,0), qabel it-trasferiment. Jekk tintuża, il-metodoloġija għall-użu xieraq ta', eż., MS-222 għall-anestezija għandha tinkiseb mingħand laboratorji tal-esperjenza u tiġi rrapportata mar-riżultati tat-testijiet. L-annimali għandhom jitneħħew b'attenzjoni matul dan it-trasferiment sabiex jitnaqqas kemm jista' jkun l-istress tat-trasferiment u jiġi evitat milli jweġġgħu.

22. L-istadju tal-iżvilupp tal-annimali huwa stabbilit billi jintuża mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari. Biex titnaqqas il-varjabbiltà finali fl-istadju tal-iżvilupp, importanti li s-sejbien tal-istadju jsir bl-ikbar preċiżjoni possibbli. Skont Nieuwkoop and Faber (8), it-tragward primarju tal-iżvilupp għall-għażla tal-organiżmi fl-istadju 51 huwa l-morfoloġija tas-sieq ta' wara. Il-karatteristiċi morfoloġiċi tas-saqajn ta' wara għandhom jiġu mixtarra taħt il-mikroskopju. Filwaqt li għandha tiġi kkonsultata l-gwida sħiħa ta' Nieuwkoop and Faber (8) għal informazzjoni komprensiva dwar is-sejbien tal-istadji tal-imrieżeb, l-istadju jista' jiġi stabbilit b'mod affidabbli billi jintużaw tragwardi morfoloġiċi prominenti. Tista' tintuża t-tabella li ġejja sabiex jiġi ssimplifikat u standardizzat il-proċess ta' sejbien tal-istadju matul l-istudju billi jiġu identifikati dawk it-tragwardi morfoloġiċi prominenti assoċjati ma' stadji differenti, jekk jiġi supponut żvilupp normali.

▼M6

Tabella 2.

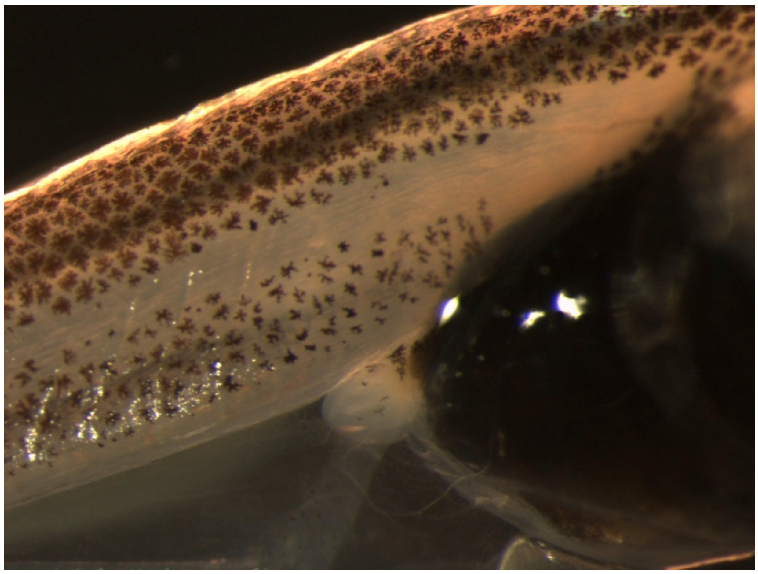
Tragwardi morfoloġiċi prominenti fis-sejbien tal-istadju fuq il-bażi tal-gwida ta' Nieuwkoop and Faber.

Tragwardi Morfoloġiċi Prominenti.	Stadju tal-Iżvilupp															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Sieq ta' Wara	X	X	X	X	X	X	X									
Saqajn ta' Quddiem						X	X	X	X	X						
Struttura tal-kranju tal-wiċċ										X	X	X	X			
Morfoloġija tan-nerv olfattiv											X	X	X			
Tul tad-denb													X	X	X	X

23. X L-iktar tragward morfoloġiku prominenti fis-sejbien tal-istadju għal dak l-istadju huwa l-morfoloġija tas-sieq ta' wara, li jintwera fil-Figura 1.

Figura 1.

Il-morfoloġija tas-sieq ta' wara ta' marżebba X. laevis tal-istadju 51.



24. Minbarra l-għażla tal-istadju tal-iżvilupp, tista' tintuża għażla fakultattiva tad-daqs tal-annimali sperimentali. Għal dan il-għan, it-tul sħiħ tal-ġisem (mhux l-SVL) għandu jitkejjel fil-jum 0 għal subkampjun ta' madwar 20 marżebba tal-istadju 51 ta' NF. Wara li jiġi kkalkolat it-tul medju tal-ġisem sħiħ għal dan il-grupp ta' annimali, jistgħu jiġu stabbiliti l-limiti minimi u massimi għat-tul tal-ġisem sħiħ tal-annimali sperimentali f'medda tal-valur medju ± 3 mm (il-valuri medji tal-medda tat-tul tal-ġisem sħiħ bejn 24,0 u 28,1 mm għal imrieżeb tal-istadju 51). Madankollu, is-sejbien tal-istadju tal-iżvilupp huwa l-parametru primarju sabiex jiġi stabbilit kemm huwa lest kull annimal tat-test. Imrieżeb li juru sfigurazzjonijiet jew korrimenti viżibbli mill-ewwel għandhom jiġu esklużi mill-assaġġ.

▼M6

25. Imrieżeb li jissodisfaw il-kriterji tal-istadju deskritti hawn fuq jinżammu f'tank mimli ilma nadif tal-koltura sakemm jitlesta l-proċess tas-sejbien tal-istadju. Ladarba jitlesta s-sejbien tal-istadju, il-larva tiġi distribwita għal għarrieda għal tankijiet tat-trattament ta' espożizzjoni sakemm kull tank ikun fih 20 larva. Imbagħad, kull tank tat-trattament jiġi spezzjonat għal annimali b'dehra anormali (eż., korrimenti, imġiba anormali meta jgħumu, eċċ.). Imrieżeb li jidher biċ-ċar li ma jkunux b'saħħithom għandhom jitneħħew mit-tankijiet tat-trattament u jinbidlu ma' larva magħżula ġdida mit-tank tar-raggruppament.

Osservazzjonijiet

26. Għal iktar informazzjoni ddettaljata dwar il-proċeduri ta' tmiem it-test u l-ipproċessar tal-imrieżeb, irreferi għad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Istoloġija tat-Tirojde tal-Amfibji (9).

Kejliet tal-Jum 7

27. Fil-jum 7, minn kull tank tat-test jitneħħew ħames imrieżeb magħżulin għal għarrieda għal kull irreplikat. Il-proċedura għal għarrieda użata għandha tagħti lil kull organiżmu tat-test probabilità ndaqs li jingħażel. Dan jista' jinkiseb billi jintuża kwalunkwe metodu ta' għażla għal għarrieda iżda jeħtieġ li kull marżebba tinqabad bix-xibka. L-imrieżeb magħżulin jitreġġgħu lura fit-tank ta' oriġini u l-imrieżeb magħżulin jiġu ewtanizzati b'mod dinjituż f'150 sa 200 mg/l, eż., MS-222, ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju sabiex tinkiseb pH 7,0. L-imrieżeb ewtanizzati jitlaħalħu fl-ilma u jitnixxfu b'taptip, u mbagħad jiġi stabbilit il-piż tal-ġisem tagħhom sal-eqreb milligramma. It-tul tas-sieq ta' wara, it-tul mill-imnieħer sal-anus, u l-istadju tal-iżvilupp (bl-użu ta' mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari) jiġu stabbiliti għal kull marżebba.

Kejliet tal-Jum 21 (Tmiem it-Test)

28. Fi tmiem it-test (jum 21), l-imrieżeb li jifdal jitneħħew mit-tankijiet tat-test u jiġu ewtanizzati b'mod dinjituż f'150 sa 200 mg/l, eż. MS 222, ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju, kif spjegat iktar 'il fuq. L-imrieżeb jitlaħilħu fl-ilma u jitnixxfu b'taptip, u mbagħad jiġi stabbilit il-piż tal-ġisem tagħhom sal-eqreb milligramma. L-istadju tal-iżvilupp, l-SVL, u t-tul tas-sieq ta' wara jitkejlu għal kull marżebba.

29. Il-larva kollha titqiegħed f'fissattiv ta' Davidson għal 48 sa 72 siegħa jew bħala kampjuni tal-ġisem sħiħ jew bħala kampjuni tat-tessut tar-ras maqtugħ li fihom ix-xedaq ta' isfel għal valutazzjonijiet istoloġiċi. Għal istopatoloġija, b'kollox għandhom jiġu kkampjunati ħames imrieżeb minn kull tank irreplikat. Peress li l-għoli taċ-ċelloli tal-follikoli jiddependi mill-istadju (10), l-iktar approċċ xieraq tal-kampjunar għall-analiżijiet istoloġiċi huwa li jintużaw individwi mqabblin mal-istadju, kull meta dan ikun possibbli. Sabiex jintgħażlu individwi mqabblin mal-istadju, l-ewwel irid jinstab l-istadju tal-larva kollha qabel l-għażla u l-ipproċessar sussegwenti għall-preservazzjoni u l-ġbir tad-dejta. Dan huwa neċessarju għaliex divergenza normali fl-iżvilupp tirriżulta f'distribuzzjonijiet differenzjali tal-istadji f'kull tank irreplikat.

30. L-annimali magħżulin għal istopatoloġija (n = 5 minn kull irreplikat) għandhom jitlaqqgħu mal-istadju medju tal-kontrolli (l-irreplikati raggruppati) kull meta dan ikun possibbli. Jekk hemm tankijiet irreplikati b'iktar minn ħames larva fl-istadju xieraq, f'dak il-każ il-ħames larva jintgħażlu għal għarrieda.

▼**M6**

31. Jekk hemm tankijiet irreplikati b'inqas minn ħames larva fl-istadju xieraq, f'dak il-każ l-individwi magħżulin mill-istadju tal-iżvilupp superjuri jew inferjuri li jmiss għandhom jiġu kampjunati sabiex jintlaħaq daqs totali tal-kampjun ta' ħames larva għal kull irreplikat. Idealment, id-deċiżjoni ta' kampjunar ta' larva addizzjonali mill-istadju tal-iżvilupp superjuri jew inferjuri li jmiss għandha tittieħed fuq il-bażi ta' evalwazzjoni ġenerali tad-distribuzzjoni tal-istadju fit-trattamenti ta' kontroll u kimiċi. Jiġifieri, jekk it-trattament kimiku jkun assoċjat ma' żvilupp tardiv, għandu mbagħad jittieħed kampjun ta' larva addizzjonali mill-istadju inferjuri li jmiss. Iżda jekk it-trattament kimiku jkun assoċjat ma' żvilupp mgħaġġel, għandu jittieħed kampjun ta' larva addizzjonali mill-istadju superjuri li jmiss.

32. F'każijiet ta' alterazzjonijiet serji fl-iżvilupp tal-imrieżeb minħabba trattament b'sustanza kimika tat-test, ma jistax ikun hemm sovrapożizzjoni tad-distribuzzjoni tal-istadju fit-trattamenti kimiċi fuq l-istadju tal-iżvilupp medju ta' kontroll ikkalkolat. F'dawn il-każijiet biss, il-proċess tal-għażla għandu jiġi mmodifikat billi jintuża stadju differenti mill-istadju medju ta' kontroll sabiex jinkiseb kampjunar imqabbel mal-istadju tal-larva għal istopatoloġija tat-tirojde. Barra minn hekk, jekk l-istadji huma indeterminati (jiġifieri asinkronija), f'dak il-każ għandhom jingħażlu 5 imrieżeb għal għarrieda minn kull irreplikat għal analiżi istoloġika. Għandha tiġi rrapportata r-raġuni għall-kampjunar ta' kwalunkwe larva li mhijiex fi stadju ekwivalenti għall-istadju tal-iżvilupp medju ta' kontroll.

Determinazzjoni tal-Punti ta' Tmiem Bijoloġiċi

33. Matul il-fażi ta' espożizzjoni tal-jum 21, il-kejl tal-punti ta' tmiem primarji jsir fil-jiem 7 u 21, madankollu hemm bżonn li l-annimali tat-test jiġu osservati kuljum. It-Tabella 3 tagħti ħarsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-kejl u l-punti ta' żmien tal-osservazzjoni korrispondenti. Hemm iktar informazzjoni ddettaljata dwar il-proċeduri tekniċi għall-kejl tal-punti ta' tmiem apikali u l-valutazzjonijiet istoloġiċi disponibbli fid-dokumenti ta' gwida tal-OECD (9).

Tabella 3.

Punti ta' żmien tal-osservazzjoni għal punti ta' tmiem primarji fl-AMA.

Punti ta' Tmiem Apikali	Kuljum	Jum 7	Jum 21
— Mortalità	•		
— Stadju tal-Iżvilupp		•	•
— Tul tas-Sieq ta' Wara		•	•
— Tul mill-Imnieħer sal-Anus		•	•
— Piż tal-Ġisem Imxarrab		•	•
— Istoloġija tal-Glandola tat-Tirojde			•

▼**M6**

Punti ta' Tmiem Apikali

34. L-istadju tal-iżvilupp, it-tul tas-sieq ta' wara, l-SVL u l-piż imxarrab huma l-punti ta' tmiem apikali tal-AMA, u kull wieħed minnhom huwa diskuss fil-qosor hawn taħt. Hemm iktar informazzjoni teknika għall-ġbir ta' din id-dejta disponibbli fid-dokumenti ta' gwida referenzjati, inklużi proċeduri għal analiżi assistita bil-kompjuter li huma rrakkomandati għall-użu.

L-Istadju tal-Iżvilupp

35. L-istadju tal-iżvilupp ta' mrieżeb *X. laevis* jiġi stabbilit bl-użu tal-kriterji tas-sejbien tal-istadju ta' Nieuwkoop and Faber (8). Id-dejta dwar l-istadju tal-iżvilupp tintuża sabiex jiġi stabbilit jekk liżvilupp huwiex mgħaġġel, asinkroniku, tardiv jew mhux affettwat. Żvilupp mgħaġġel jew tardiv huwa stabbilit billi jsir paragun bejn l-istadju medju miksub mill-grupp ta' kontroll u dak ittrattat. Żvilupp asinkroniku huwa rrapportat meta t-tessuti eżaminati ma jkunux sfigurati jew anormali, iżda t-twaqqit relattiv tal-morfoġenesi jew l-iżvilupp ta' tessuti differenti jkun imfixkel fi ħdan marżebba waħda.

It-Tul tas-Sieq ta' Wara

36. Differenzazzjoni u tkabbir tas-sieq ta' wara huma taħt il-kontroll tal-ormoni tat-tirojde u huma tragwardi kbar tal-iżvilupp li diġà huma użati meta jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp. L-iżvilupp tas-sieq ta' wara jintuża b'mod kwalitattiv meta jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp, iżda hawnhekk jitqies bħala punt ta' tmiem kwantitattiv. Għaldaqstant, it-tul tas-sieq ta' wara jitkejjel bħala punt ta' tmiem sabiex jiġu identifikati l-effetti fuq l-assi tat-tirojde (Figura 2). Għal konsistenza, it-tul tas-sieq ta' wara jitkejjel fuq is-sieq xellugija ta' wara. It-tul tas-sieq ta' wara jiġi evalwat fil-jum 7 u fil-jum 21 tat-test. Fil-jum 7, il-kejl tas-sieq ta' wara huwa sempliċi, kif muri fil-Figura 2. Madankollu, il-kejl tat-tul tas-sieq ta' wara fil-jum 21 huwa iktar ikkumplikat minħabba liwjiet fis-sieq. Għaldaqstant, il-kejliet tas-sieq ta' wara fil-jum 21 għandhom jibdew mir-rita ta' barra tal-ġisem u jsegwu l-linja medjana tas-sieq u jibqgħu għaddejjin minn kwalunkwe devjazzjoni fl-angoli. Bidliet fit-tul tas-sieq fil-jum 7, anki jekk ma jkunux evidenti fil-jum 21, xorta waħda jitqiesu sinifikanti għal attività potenzjali tat-tirojde. Il-kejliet tat-tul jinkisbu minn ritratti diġitali bl-użu ta' software ta' analiżi tal-immaġnijiet kif spjegat fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Istoloġija tat-Tirojde tal-Amfibji (9).

It-Tul tal-Ġisem u l-Piż Imxarrab

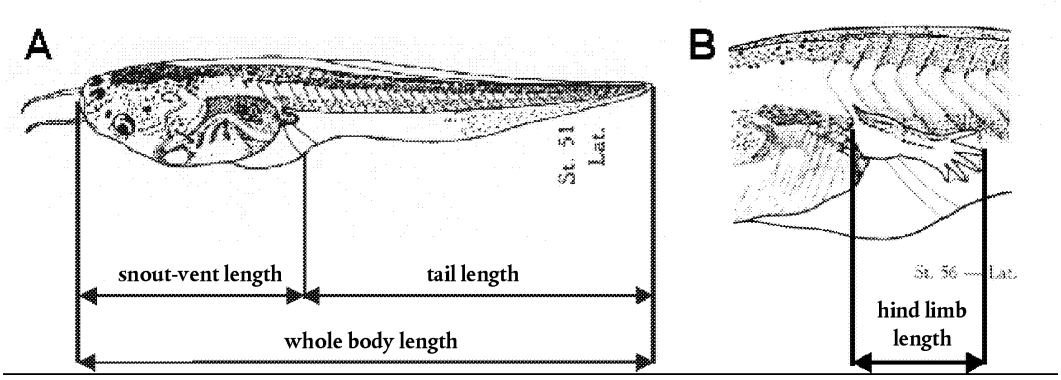
37. Il-kalkoli tat-tul mill-imnieħer sal-anus (SVL) (Figura 2) u l-piż imxarrab huma inklużi fil-protokoll tat-test sabiex jiġu vvalutati l-effetti possibbli tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq ir-rata tat-tkabbir tal-imrieżeb meta mqabblin mal-grupp ta' kontroll u huma siewja sabiex tinstab it-tossiċità ġeneralizzata għas-sustanza kimika tat-test. Peress li t-tneħħija tal-ilma aderenti għall-kalkoli tal-piż tista' tikkaġuna kundizzjonijiet stressanti għall-imrieżeb u tista' tikkaġuna ħsara fuq il-ġilda, dawn il-kejliet isiru fuq l-imrieżeb tas-subkampjun tal-jum 7 u l-imrieżeb kollha li jifdal fi tmiem it-test (jum 21). Għal konsistenza, uża l-aspett kranjali tal-anus bħala l-limitu inferjuri tal-kejl.

38. It-tul mill-imnieħer sal-anus (SVL) jintuża biex jiġi vvalutat kemm kibret il-marżebba kif muri fil-Figura 2.

▼M6

Figura 2.

(A) It-tipi ta' kejliet tat-tul tal-ġisem u (B) Il-kejliet tat-tul tas-sieq ta' wara għal imrieżeb X. laevis (1).



Istoloġija tal-Glandola tat-Tirojde

39. Filwaqt li l-istadju tal-iżvilupp u t-tul tas-sieq ta' wara huma punti ta' tmiem importanti biex jiġu evalwati bidliet marbutin mal-espożizzjoni fl-iżvilupp metamorfiku, żvilupp tardiv, minnu nnifsu, ma jistax jitqies bħala indikatur djanjostiku ta' attività antitirojde. Ċerti bidliet jistgħu jiġu osservati biss permezz ta' analiżi istopatoloġika ta' rutina. Il-kriterji djanjostiċi jinkludu ipertrofija/atrofija tal-glandola tat-tirojde, ipertrofija taċ-ċelloli follikolari, iperplażja taċ-ċelloli follikolari, u bħala kriterji kwali-tattivi addizzjonali: żona tal-lumen follikolari, kwalità tal-kollojde u tul/forma taċ-ċelloli follikolari. Għandu jiġi rrapportat il-grad tas-severità (4 gradi). Informazzjoni dwar il-kisba u l-ipproċessar ta' kampjuni għal analiżi istoloġika u għat-twettiq ta' analiżijiet istoloġiċi fuq kampjuni ta' tessuti hija disponibbli fl-"Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji: Parti 1 — Gwida teknika għall-kampjunar morfoloġiku u t-ħejjija istoloġika" u "Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji: Parti 2 — Approċċ għall-qari ta' studji, kriterji djanjostiċi, klassifikazzjoni tas-severità u atlas" (9). Laboratorji li jagħmlu l-assaġġ għall-ewwel darba/drabi għandhom ifittxu pariri mingħand patoloġisti tal-esperjenza għal skopijiet ta' taħriġ qabel ma jagħmlu analiżi istoloġika u evalwazzjoni tal-glandola tat-tirojde. Bidliet kbar u sinifikanti fil-punti ta' tmiem apikali li jindikaw żvilupp mgħaġġel jew asinkronija jistgħu jipprekludu l-ħtieġa li ssir analiżi istopatoloġika tal-glandoli tat-tirojde. Madankollu, nuqqas ta' bidliet morfoloġiċi ċari jew evidenza ta' żvilupp tardiv huma motivi validi għal analiżijiet istoloġiċi.

Mortalità

40. It-tankijiet tat-test kollha għandhom jiġu vverifikati kuljum għal imrieżeb mejtin u n-numri jridu jiġu rreġistrati għal kull tank. Għandhom jitniżżlu d-data, il-konċentrazzjoni u n-numru tat-tank għal kwalunkwe osservazzjoni tal-mortalità. L-annimali mejtin għandhom jitneħħew mit-tank tat-test malli jiġu osservati. Rati tal-mortalità li jaqbżu l-10 % jistgħu jindikaw kundizzjonijiet tat-test mhux xierqa jew effetti tossiċi tas-sustanza kimika tat-test.

Osservazzjonijiet Addizzjonali

41. Każijiet ta' mġiba anormali u sfigurazzjonijiet u leżjonijiet li jidhru mill-ewwel għandhom jiġu rreġistrati. Id-data, il-konċentrazzjoni u n-numru tat-tank għandhom jiġu rreġistrati għal kwalunkwe osservazzjoni ta' mġiba

▼M6

anormali, sfigurazzjonijiet jew leżjonijiet kbar. Imġiba normali hija kkaratterizzata minn imrieżeb sospiżi fil-kolonna tal-ilma bid-denb 'il fuq fuq ir-ras, taħbit ritmiku regolari tal-pinna tad-denb, tlugħ perjodiku fil-wiċċ, operkulazzjoni, u risponsività għall-istimoli. Imġiba anormali tinkludi, pereżempju, meta jibqgħu fil-wiċċ, mimdudin f'qiegħ it-tank, jgħowmu b'lura jew b'mod irregolari, ma tantx ikunu attivi fil-wiċċ, u ma tantx ikunu risponsivi għall- istimoli. Barra minn hekk, għandu jinżamm rekord tad-differenzi gross fil-konsum tal-ikel bejn it-trattamenti. Sfigurazzjonijiet u leżjonijiet kbar jistgħu jinkludi anormalitajiet morfoloġiċi (eż. deformitajiet tas-saqajn), leżjonijiet emorraġiċi, infezzjonijiet batterjali jew fungali, li huma biss ftit minnhom. Dawn il-kalkoli huma kwalitattivi u għandhom jitqiesu l-istess bħal sinjali kliniċi ta' mard/stress u jsiru f'paragun mal-annimali ta' kontroll. Jekk l-okkorrenza jew ir-rata ta' okkorrenza tkun ikbar fit-tankijiet esposti milli fil-kontrolli, f'dak il-każ dawn għandhom jitqiesu bħala evidenza għal tossiċità kbira.

DEJTA U RAPPORTAR

Ġbir ta' Dejta

42. Id-dejta kollha għandha tinġabar bl-użu ta' sistemi elettroniċi jew manwali li jikkonformaw ma' prattiki tajbin tal-laboratorju (GLP). Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

Is-sustanza kimika tat-test:

— Karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: karatteristiċi fiżikokimiċi; informazzjoni fuq l-istabbiltà u l-bijodegradabilità;

— Informazzjoni u dejta dwar is-sustanza kimika: metodu u frekwenza tal-preparazzjoni ta' dilwizzjonijiet. L-informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test tinkludi konċentrazzjonijiet propji u nominali tas-sustanza kimika tat-test, u f'xi każijiet, sustanza kimika mhux oriġinarja, kif xieraq. Il-kejliet tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jkunu meħtieġa għal soluzzjonijiet ewlenin kif ukoll għal soluzzjonijiet tat-test;

— Solvent (jekk mhuwiex ilma): ġustifikazzjoni tal-għażla tas-solvent, u karatterizzazzjoni tas-solvent (għamla, konċentrazzjoni użata);

Kundizzjonijiet tat-test:

— Rekords operazzjonali: dawn jikkonsistu f'osservazzjonijiet li jappartjenu għat-tħaddim tas-sistema tat-test u l-ambjent u l-infrastruttura ta' sostenn. Ir-rekords tipiċi jinkludu: temperatura ambjentali, temperatura tat-test, fotoperjodu, status tal-komponenti kritiċi tas-sistema ta' espożizzjoni (eż. pompi, ċiklometri, pressjonijiet), rati tal-fluss, livelli tal-ilma, bidliet tal-flixkun tal-istokkijiet, u rekords dwar it-tmigħ. Il-parametri ġenerali tal-kwalità tal-ilma jinkludu: pH, DO, kondottività, jodju totali, alkalinità u l-ebusija;

— Devjazzjonijiet mill-metodu ta' ttestjar: din l-informazzjoni għandha tinkludi kwalunkwe informazzjoni jew deskrizzjoni narrattiva ta' devjazzjonijiet mill-metodu ta' ttestjar;

Riżultati:

— Osservazzjonijiet u dejta bijoloġiċi: dawn jinkludu osservazzjonijiet ta' kuljum tal-mortalità, konsum ta' ikel, imġiba anormali tal-għawm, letarġija, telf ta' ekwilibriju, sfigurazzjonijiet, leżjonijiet, eċċ. Osservazzjonijiet u dejta miġburin f'intervalli prestabbiliti jinkludu: stadju tal-iżvilupp, tul tas-sieq ta' wara, tul mill-imnieħer sal-anus, u l-piż imxarrab;

▼M6

— Tekniki analitiċi statistiċi u ġustifikazzjoni tat-tekniki użati; riżultati tal-analiżi statistika, idealment f'forma ta' tabella;

— Dejta istoloġika: dawn jinkludu deskrizzjonijiet narrattivi, kif ukoll il-punteġġi tas-severità u l-inċidenza kklassifikati tal-osservazzjonijiet speċifiċi, kif spjegati fid-dokument ta' gwida dwar l-istopatoloġija;

— Osservazzjonijiet ad hoc: dawn l-osservazzjonijiet għandhom jinkludu deskrizzjonijiet narrattivi tal-istudju li ma joqogħdux fil-kategoriji deskritti qabel.

Rapportar tad-dejta

43. L-Appendiċi 2 fih spreadsheets tal-ġbir ta' dejta ta' kuljum li jistgħu jintużaw bħala gwida għat-tidħil tad-dejta mhux ipproċessata u għall-kalkoli ta' statistiki sommarji. Barra minn hekk, huma pprovduti tabelli tar-rapportar li huma konvenjenti għall-komunikazzjoni ta' sommarji ta' dejta dwar il-punti ta' tmiem. It-tabelli ta' rapportar għal valutazzjonijiet istoloġiċi jistgħu jinstabu fl-Appendiċi 2.

Kriterji tal-Prestazzjoni u Aċċettabilità/Validità tat-Test

44. Ġeneralment, devjazzjonijiet kbar mill-metodu ta' ttestjar ser iwasslu għal dejta mhux aċċettabbli għall-interpretazzjoni jew ir-rapportar. Għaldaqstant, il-kriterji li ġejjin fit-Tabella 4 ġew żviluppati bħala gwida sabiex tiġi stabbilita l-kwalità tat-test imwettaq, il-prestazzjoni ġenerali tal-organiżmi ta' kontroll.

Tabella 4.

Il-kriterji ta' prestazzjoni għall-AMA.

Kriterju	Limiti aċċettabbli
Konċentrazzjonijiet tat-test	Miżmuma f'≤ 20 % CV(varjabbiltà tal-konċentrazzjoni tat-test imkejla) tul it-test ta' 21 jum
Mortalità fil-kontrolli	≤ 10 % — il-mortalità fi kwalukwe rreplikat minnhom fil-kontrolli ma għandhiex taqbeż iż-2 imrieżeb
L-istadju tal-iżvilupp medju minimu tal-kontrolli fi tmiem it-test	57
Il-firxa tal-istadju tal-iżvilupp fil-grupp ta' kontroll	L-10 u d-90 perċentil tad-distribuzzjoni tal-istadju tal-iżvilupp ma għandhomx ivarjaw b'iktar minn 4 stadji
Ossiġenu Dissolt	≥ 40 % saturazzjoni tal-arja (*)
pH	il-pH għandha tinżamm bejn 6,5-8,5. Id-differenzjali interreplikati/intertrattament ma għandhiex taqbeż iż-0,5.
Temperatura tal-ilma	22° ± 1 °C — id-differenzjali interreplikati/intertrattament ma għandhiex taqbeż iż-0,5 °C
Konċentrazzjonijiet tat-test mingħajr tossiċità ċara	≥ 2
Prestazzjoni tal-irreplikati	≤ 2 irreplikati fit-test jistgħu jkunu f'riskju

▼M6

Kriterju	Limiti aċċettabbli
Kundizzjonijiet speċjali għall-użu ta' solvent	Jekk jintuża solvent trasportatur, għandu jintuża kemm kontroll tas-solvent kif ukoll kontroll tal-ilma nadif u r-riżultati għandhom jiġu rrapportati
	Differenzi statistikament importanti bejn il-kontroll tas-solvent u l-gruppi ta' kontroll tal-ilma huma ttrattati b'mod separat. Ara iktar 'il quddiem għal iktar informazzjoni
Kundizzjonijiet speċjali għas-sistema ta' tiġdid statiku	Għandhom jiġu rrapportati l-analiżijiet tas-sustanzi kimiċi rappreżentattivi qabel u wara t-tiġdid
	Il-livelli tal-ammonijaka għandhom jitkejlu eżatt qabel it-tiġdid
	Il-parametri kollha tal-kwalità tal-ilma elenkati fit-Tabella 1 tal-Appendiċi 1 għandhom jitkejlu eżatt qabel it-tiġdid
	Il-perjodu ta' tiġdid ma għandux jaqbeż it-72 siegħa
	L-iskeda xierqa tat-tmigħ (50 % tal-proporzjon tal-ikel ta' kuljum tal-għalf kummerċjali tal-imrieżeb) (*)

(*) L-ossiġenazzjoni tal-ilma tista' tinkiseb b'apparati baqbieqa. Huwa rrakkomandat li l-apparati baqbieqa jiġu stabbiliti f'livelli li ma joħolqux stress żejjed għall-imrieżeb.

Validità tat-Test

45. Ir-rekwiżiti li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati sabiex test jitqies aċċettabbli/validu:

Esperiment validu f'test stabbilit bħala negattiv għall-attività tat-tirojde:

(1) Għal kwalunkwe trattament partikolari (inklużi kontrolli), il-mortalità ma tistax taqbeż l-10 %. Għal kwalunkwe rreplikat partikolari, il-mortalità ma tistax taqbeż it-tliet imrieżeb, inkella l-irreplikat jitqies li huwa f'riskju

(2) Tal-inqas żewġ livelli tat-trattament, bl-erba' rreplikati mhux f'riskju kollha, għandhom ikunu disponibbli għal analiżi

(3) Tal-inqas żewġ livelli mingħajr tossiċità kbira għandhom ikunu disponibbli għal analiżi

Esperiment validu f'test stabbilit bħala pożittiv għal attività tat-tirojde:

(1) Il-mortalità ta' mhux iktar minn żewġ imrieżeb/irreplikati fil-grupp ta' kontroll tista' sseħħ

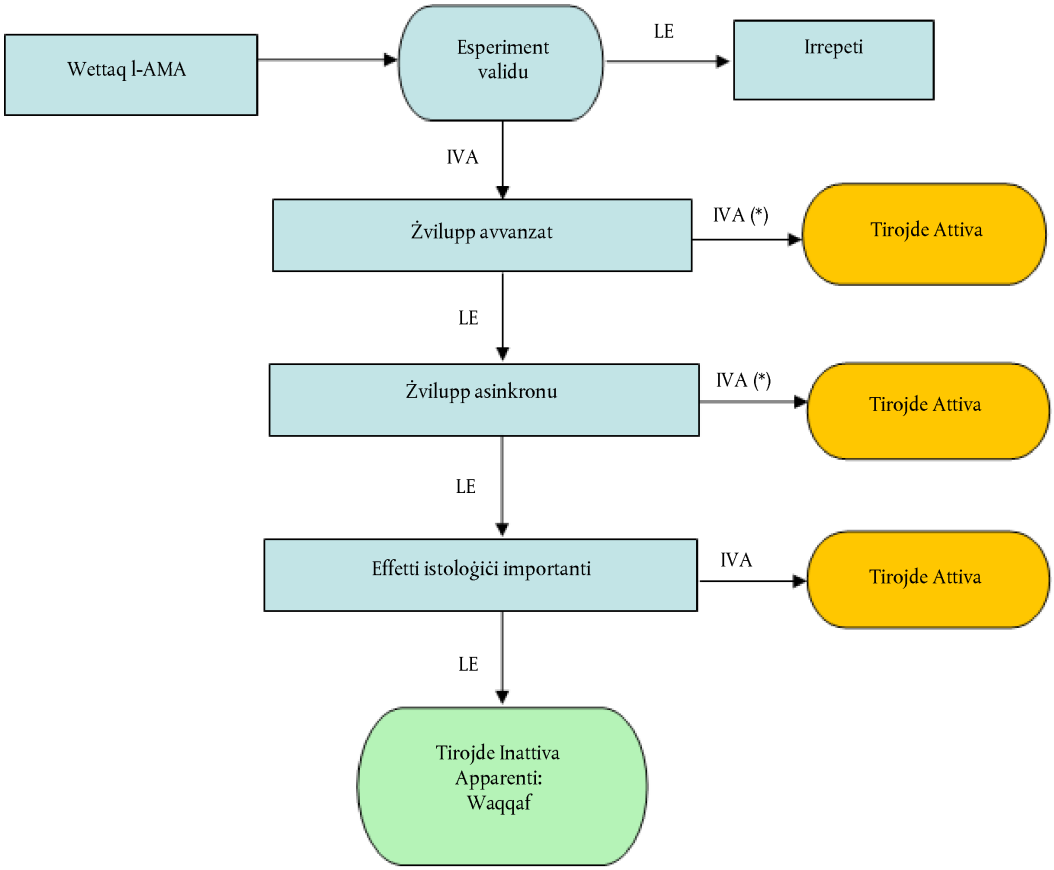
Loġika wara d-deċiżjoni għat-twettiq tal-AMA

46. Il-loġika wara d-deċiżjoni ġiet żviluppata għall-AMA sabiex tingħata assistenza loġika fit-twettiq u l-interpretazzjoni tar-riżultati tal-bijoassaġġ (ara l-flowchart fil-Figura 3). Essenzjalment, il-loġika wara d-deċiżjoni tixtarr il-punti ta' tmiem f'dak l-iżvilupp avvanzat, l-iżvilupp asinkroniku u l-istopatoloġija tat-tirojde jingħataw ponderazzjoni importanti, filwaqt li l-iżvilupp tardiv, it-tul mill-imnieħer sal-anus u l-piż tal-ġisem imxarrab, parametri li għandhom il-potenzjal li jkunu affettwati mit-tossiċità ġenerali, jingħataw ponderazzjoni inqas importanti.

▼M6

Figura 3.

Il-loġika wara d-deċiżjoni għat-twettiq tal-AMA.



(*) L-istoloġija tista' tkun meħtieġa minn ċerti awtoritajiet regolatorji minkejja differenzi importanti fl-iżvilupp avvanzat u asinkroniku. L-entità li tagħmel dan it-test hija mħeġġa tikkonsulta lill-awtoritajiet meħtieġa qabel tagħmel it-test sabiex tistabbilixxi liema punti ta' tmiem huma meħtieġa.

Żvilupp avvanzat (stabbilit bl-użu tal-istadju tal-iżvilupp, l-SVL u l-HLL)

47. L-iżvilupp avvanzat huwa magħruf li jseħħ biss bl-effetti li huma relatati mal-ormon tat-tirojde. Dawn jistgħu jkunu effetti tat-tessut periferali bħal interazzjoni diretta mar-riċettur tal-ormon tat-tirojde (bħal bit-T4) jew effetti li jibdlu l-livelli tal-ormon tat-tirojde ċirkolanti. Ikun xi jkun il-każ, dan jitqies bħala prova biżżejjed li tindika li s-sustanza kimika għandha attività fit-tirojde. L-iżvilupp avvanzat huwa evalwat b'mod wieħed minn tnejn. L-ewwel, l-istadju tal-iżvilupp ġenerali jista' jiġi evalwat billi jintuża l-approċċ standardizzat spjegat f'Nieuwkoop and Faber (8). It-tieni, karatteristiċi morfoloġiċi speċifiċi jistgħu jiġu kkwantifikati, bħat-tul tas-sieq ta' wara, fil-jum 7 u 21, li għandu assoċjazzjoni pożittiva mal-effetti agonistiċi fuq ir-riċettur tal-ormon tat-tirojde. Jekk isiru avvanzi statistikament sinifikanti fl-iżvilupp jew fit-tul tas-sieq ta' wara, f'dak il-każ it-test jindika li s-sustanza kimika hija attiva fit-tirojde.

▼**M6**

48. L-evalwazzjoni tal-annimali tat-test għall-preżenza ta' żvilupp mgħaġġel b'rabta mal-popolazzjoni ta' kontroll ser tkun imsejsa fuq ir-riżultati ta' analiżijiet statistiċi mwettqin għall-erba' punti ta' tmiem li ġejjin:

— it-tul tas-sieq ta' wara (normalizzat mill-SVL) fil-jum 7 tal-istudju

— it-tul tas-sieq ta' wara (normalizzat mill-SVL) fil-jum 21 tal-istudju

— l-istadju tal-iżvilupp fil-jum 7 tal-istudju

— l-istadju tal-iżvilupp fil-jum 21 tal-istudju

49. L-analiżijiet statistiċi tat-tul tas-sieq ta' wara għandhom isiru fuq il-bażi tal-kejliet tat-tul tas-sieq xellugija ta' wara. It-tul tas-sieq ta' wara huwa normalizzat billi jittieħed il-proporzjon tat-tul tas-sieq ta' wara għat-tul mill-imnieħer għall-anus ta' individwu. Imbagħad titqabbel il-medja tal-valuri normalizati għal kull livell tat-trattament. Imbagħad, l-aċċelerazzjoni tal-iżvilupp tiġi indikata minn żieda importanti fit-tul medju tas-sieq ta' wara (normalizzat) fi grupp tat-trattament bis-sustanza kimika meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll fil-jum 7 tal-istudju u/jew fil-jum 21 tal-istudju (ara l-Appendiċi 3).

50. L-analiżijiet statistiċi tal-istadju tal-iżvilupp għandhom isiru fuq il-bażi tal-istabbiliment tal-istadji tal-iżvilupp skont il-kriterji morfoloġiċi deskritti minn Nieuwkoop and Faber (8). Żvilupp mgħaġġel huwa indikat meta l-analiżi multikwantali ssib żieda importanti fil-valuri tal-istadju tal-iżvilupp fi grupp tat-trattament bis-sustanza kimika meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll fil-jum 7 tal-istudju u/jew fil-jum 21 tal-istudju.

51. Fil-metodu ta' ttestjar tal-AMA, effett importanti fuq kwalunkwe wieħed mill-erba' punti ta' tmiem imsemmijin hawn fuq jitqies biżżejjed għal identifikazzjoni pożittiva ta' żvilupp mgħaġġel. Jiġifieri, effetti importanti fuq it-tul tas-sieq ta' wara f'punt ta' żmien speċifiku ma jeħtiġux li jiġu korroborati minn effetti importanti fuq it-tul tas-sieq ta' wara f'punt ta' żmien ieħor u lanqas minn effetti importanti fuq l-istadju tal-iżvilupp f'dan il-punt ta' żmien speċifiku. Min-naħa tagħhom, effetti importanti fuq l-istadju tal-iżvilpp f'punt ta' żmien speċifiku ma jeħtiġux li jiġu korroborati minn effetti importanti fl-istadju tal-iżvilupp f'punt ta' żmien ieħor u lanqas minn effetti importanti fuq it-tul tas-sieq f'dan il-punt ta' żmien speċifiku. Il-piż tal-evidenza għall-iżvilupp mgħaġġel xorta waħda ser jiżdied jekk jinstabu effetti importanti għal iktar minn punt ta' tmien wieħed.

Żvilupp asinkroniku (stabbilit bl-użu ta' kriterji tal-istadju tal-iżvilupp)

52. L-iżvilupp asinkroniku huwa kkaratterizzat minn tfixkil tat-twaqqit relattiv tal-morfoġenesi jew l-iżvilupp ta' tessuti differenti fi ħdan marżebba individwali. In-nuqqas ta' ħila li jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp ta' organiżmu bl-użu tal-firxa ta' punti ta' tmiem morfoloġiċi meqjusin tipiċi ta' kwalunkwe stadju partikolari jindika li t-tessuti qed jiżviluppaw b'mod asinkroniku bil-metamorfożi. L-iżvilupp asinkroniku huwa indikatur ta' attività fit-tirojde. L-uniċi modalitajiet magħrufin ta' azzjoni li jikkaġunaw żvilupp asinkroniku huma permezz tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fuq azzjoni tal-ormon tat-tirojde periferali u/jew metaboliżmu tal-ormon tat-tirojde fl-iżvilupp ta' tessuti kif inhu osservat b'inibituri tad-dejodinaży.

▼**M6**

53. L-evalwazzjoni tal-annimali tat-test għall-preżenza ta' żvilupp asinkroniku relatat mal-popolazzjoni tal-kontroll ser tkun ibbażata fuq valutazzjoni morfoloġika gross tal-annimali tat-test fil-jum 7 tal-istudju u fil-jum 21 tal-istudju.

54. Id-deskrizzjoni tal-iżvilupp normali tal-*Xenopus laevis* minn Nieuwkoop and Faber (8) tipprovdi l-qafas għall-identifikazzjoni ta' ordni sekwenzjali tar-rimodellar tat-tessut normali. It-terminu "żvilupp asinkroniku" jirreferi b'mod speċifiku għal dawk id-devjazzjonijiet fl-iżvilupp morfoloġiku gross tal-imrieżeb li ma jippermettux li jiġi stabbilit b'mod definittiv stadju tal-iżvilupp skont il-kriterji ta' Nieuwkoop and Faber (8) għaliex tragwardi morfoloġiċi importanti juru karatteristiċi ta' stadji differenti.

55. Kif jimplika t-terminu "żvilupp asinkroniku", huma biss każijiet li juru devjazzjonijiet fil-progress ta' mmudellar mill-ġdid tat-tessuti speċifiċi relatati mal-progress tal-immudellar mill-ġdid ta' tessuti oħrajn li għandhom jiġu kkunsidrati. Ċerti fenotipi klassiċi jinkludu dewmien jew nuqqas ta' emerġenza tas-saqajn ta' wara minkejja żvilupp normali jew avvanzat tas-saqajn ta' wara u t-tessuti tad-denb, jew ir-risorbiment prekoċi tal-garġi b'rabta mal-istadju tal-morfoġenesi tas-saqajn ta' wara u r-risorbiment tad-denb. Annimal ser jiġi rreġistrat li qed juri żvilupp asinkroniku jekk ma jkunx jista' jiġi assenjat fi stadju għaliex jonqos milli jissodisfa l-maġġor parti tal-kriterji tal-iżvilupp tragward għal stadju partikolari ta' Niewkoop and Faber (8), jew jekk ikun hemm ittardjar jew aċċelerazzjoni estremi ta' karatteristika importanti waħda jew iktar (eż. risorbiment sħiħ tad-denb, iżda s-saqajn ta' quddiem ma jkunux feġġew). Din il-valutazzjoni ssir b'mod kwalitattiv u għandha teżamina l-firxa sħiħa ta' karatteristiċi tragward elenkati minn Niewkoop and Faber (8). Madankollu, ma hemmx bżonn li jiġi rreġistrat l-istat tal-iżvilupp tad-diversi karatteristiċi tragward tal-annimali osservati. Annimali rreġistrati li juru żvilupp asinkroniku mhumiex assenjati stadju tal-iżvilupp ta' Niewkoop and Faber (8).

56. B'hekk, kriterju ċentrali għad-deżinjazzjoni ta' każijiet ta' żvilupp morfoloġiku anormali bħala "żvilupp asinkroniku" huwa li t-twaqqit relattiv tal-immudellar mill-ġdid tat-tessuti u l-morfoġenesi tat-tessut huwa mxekkel filwaqt li l-morfoloġija tat-tessuti affettwati mhijiex anormali biċ-ċar. Eżempju li juri din l-interpretazzjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi gross huwa li l-morfoġenesi ttardjata tas-saqajn ta' wara b'rabta mal-iżvilupp ta' tessuti oħrajn ser tissodisfa l-kriterju ta' "żvilupp asinkroniku" filwaqt li każijiet li juru saqajn ta' wara niqsin, swaba' anormali (eż. ettrodattilja, polidattilja), jew sfigurazzjonijiet ċari oħrajn tas-saqajn ma għandhomx jitqiesu bħala "żvilupp asinkroniku".

57. F'dan il-kuntest, it-tragwardi morfoloġiċi l-kbar li għandhom jiġu evalwati għall-progress metamorfiku koordinat tagħhom għandhom jinkludu morfoġenesi tas-saqajn ta' wara, morfoġenesi tas-saqajn ta' quddiem, feġġa tas-saqajn ta' quddiem, l-istadju tar-risorbiment tad-denb (b'mod partikolari r-risorbiment tal-pinna tad-denb), u l-morfoloġija tar-ras (eż. daqs tal-garġi u daqs tar-risorbiment tal-garġi, morfoloġija tax-xedaq ta' taħt, protrużjoni tal-qarquċa ta' Mechel).

58. Skont il-modalità tal-azzjoni tas-sustanza kiika, jistgħu jseħħu fenotipi morfoloġiċi gross differenti. Ċerti fenotipi klassiċi jinkludu ttardjar jew nuqqas ta' feġġa tas-saqajn ta' quddiem minkejja żvilupp normali jew avvanzat tas-saqajn ta' wara u t-tessuti tad-denb, risorbiment prekoċi tal-garġi b'rabta mal-immudellar mill-ġdid tas-saqajn ta' wara u tad-denb.

▼**M6**

Istopatoloġija

59. Jekk is-sustanza kimika ma tikkaġunax tossiċità importanti u ma tħaffifx l-iżvilupp jew tikkaġuna żvilupp asinkroniku, f'dak il-każ l-istopatoloġija tal-glandoli tat-tirojde tiġi evalwata bl-użu tad-dokument ta' gwida xieraq (9). L-ittardjar tal-iżvilupp, fin-nuqqas ta' tossiċità, huwa indikatur b'saħħtu ta' attività antitirojde, iżda l-analiżi tal-istadju tal-iżvilupp hija inqas sensittiva u inqas djanjostika mill-analiżi istopatoloġika tal-glandola tat-tirojde. Għalhekk, f'dan il-każ huwa meħtieġ li jsiru analiżijiet istopatoloġiċi tal-glandoli tat-tirojde. L-effetti fuq l-istoloġija tal-glandola tat-tirojde ntwerew fin-nuqqas ta' effetti tal-iżvilpp. Jekk iseħħu bidliet fl-istopatoloġija tat-tirojde, is-sustanza kimika titqies li hija attiva fit-tirojde. Jekk ma jkun osservat ebda ttardjar fl-iżvilupp jew leżjonijiet istoloġiċi fil-glandoli tat-tirojde, is-sustanza kimika titqies li hija inattiva fit-tirojde. Il-ħsieb wara din id-deċiżjoni huwa li l-glandola tat-tirojde hija taħt l-influwenza tat-TSH u kwalunkwe sustanza kimika li tibdel l-ormon tat-tirojde ċirkolanti biżżejjed tant li tinbidel is-sekrezzjoni tat-TSH ser tirriżulta f'bidliet istopatoloġiċi fil-glandoli tat-tirojde. Diversi modalitajiet u mekkaniżmi ta' azzjoni jistgħu jibdlu l-ormon tat-tirojde ċirkolanti. B'hekk, filwaqt li l-livell tal-ormon tat-tirojde jindika effett marbut mat-tirojde, dan mhuwiex biżżejjed sabiex jiġi stabbilit liema modalità jew mekkaniżmu ta' azzjoni huma marbutin mar-rispons.

60. Peress li dan il-punt ta' tmiem mhuwiex attribwibbli għal approċċi statistiċi bażiċi, opinjoni esperta ta' patoloġist għandha tistabbilixxi effett marbut mal-espożizzjoni għal sustanza kimika.

Żvilupp tardiv (stabbilit bl-użu tal-istadju tal-iżvilupp, HLL, BW, SVL)

61. Żvilupp tardiv jista' jseħħ permezz ta' mekkaniżmi antitirojde u permezz ta' tossiċità indiretta. Ittardjar ħafif fl-iżvilupp flimkien ma' sinjali ċari ta' tossiċità aktarx li jindikaw effett tossiku mhux speċifiku. Evalwazzjoni tat-tossiċità mhux tat-tirojde hija element essenzjali tat-test biex titnaqqas il-probabilità ta' riżultati ta' pożittiv falz. Mortalità eċċessiva hija indikazzjoni ovvja li qed iseħħu mekkaniżmi tossiċi oħrajn. B'mod simili, tnaqqisiet ħfief fit-tkabbir, kif stabbiliti mill-piż imxarrab u/jew it-tul tal-SVL, jissuġġerixxu tossiċità mhux tat-tirojde wkoll. Żidiet apparenti fit-tkabbir huma osservati spiss b'sustanzi kimiċi li jaffettwaw l-iżvilupp normali b'mod negattiv. Konsegwentement, il-preżenza ta' annimali kbar mhux bilfors li tindika tossiċità mhux tat-tirojde. Madankollu, it-tkabbir qatt ma għandu jkun l-unika bażi sabiex tiġi stabbilita t-tossiċità tat-tirojde. Minflok għandhom jintużaw it-tkabbir flimkien mal-istadju tal-iżvilupp u l-istopatoloġija tat-tirojde sabiex tiġi stabbilita l-attività tat-tirojde. Punti ta' tmiem oħrajn għandhom jiġu kkunsidrati wkoll meta tiġi stabbilita tossiċità ċara inklużi edema, leżjonijiet emorraġiċi, letarġija, konsum inqas ta' ikel, imġiba tal-għawm stramba/mibdula, eċċ. Jekk il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test juru sinjali ta' tossiċità ċara, is-sustanza kimika tat-test għandha terġa' tiġi evalwata f'konċentrazzjonijiet inqas tat-test qabel jiġi stabbilit jekk is-sustanza kimika hijiex potenzjalment attiva jew inattiva fit-tirojde.

62. Ittardjar statistikament importanti fl-iżvilupp, fin-nuqqas ta' sinjali oħrajn ta' tossiċità ċara, jindika li s-sustanza kimika hija attiva fit-tirojde (antagonistika). Fin-nuqqas ta' risponsi statistiċi kbar, dan l-eżitu jista' jissaħħaħ b'riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde.

▼M6

Analiżijiet statistiċi

63. Idealment, l-analiżijiet statistiċi tad-dejta għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (11). Għall-punti ta' tmiem kwantitattivi kontinwi kollha (HLL, SVL, piż imxarrab) konsistenti ma' doża-rispons monotoni, għandu jiġi applikat it-test rigressiv ta' Jonckheere-Terpstra sabiex jiġi stabbilit effett tat-trattament importanti.

64. Għal punti ta' tmiem kontinwi li mhumiex konsistenti ma' doża-rispons monotoni, id-dejta għandha tiġi vvalutata għan-normalità (idealment billi jintuża t-test ta' Shapiro-Wilk jew Anderson-Darling) u omoġenità tal-varjanza (idealment bl-użu tat-test ta' Levene). Iż-żewġ testijiet isiru fuq ir-residwi minn ANOVA. Jista' jintuża ġudizzju espert minflok dawn it-testijiet formali għan-normalità u l-omoġenità tal-varjanza, għad li t-testijiet formali huma ppreferuti. Meta tinstab nonnormalità jew eteroġenità tal-varjanza, għandha titfittex trasformazzjoni normalizzanti li tistabbilizza l-varjanza. Jekk id-dejta (forsi wara trasformazzjoni) normalment tiġi distribwita b'varjanza omoġena, it-test ta' Dunnett jistabbilixxi effett tat-trattament sinifikanti. Jekk id-dejta (forsi wara trasformazzjoni) normalment tiġi distribwita b'varjanza eteroġena, it-test ta' Tamhane-Dunnett jew T3 jew it-test-U ta' Mann-Whitney-Wilcoxon jistabbilixxi effett tat-trattament sinifikanti. Meta ma tkun tista' tinstab ebda trasformazzjoni normalizzanti, effett tat-trattament jiġi stabbilit mit-test-U ta' Mann-Whitney-Wilcoxon bl-użu ta' aġġustament ta' Bonferroni-Holm għall-valuri-p. It-test ta' Dunnett huwa applikat b'mod indipendenti minn kwalunkwe test-F ANOVA u t-test ta' Mann-Whitney huwa applikat b'mod indipendenti minn kwalunkwe test ġenerali ta' Kruskall-Wallis.

65. Mortalità sinifikanti mhijiex mistennija iżda għandha tiġi vvalutata mit-test rigressiv ta' Cochran-Armitage li fih id-dejta hija konsistenti mal-monotoniċità tad-doża-rispons, u nkella mit-test Eżatt ta' Fisher b'aġġustament Bonferroni-Holm.

66. Effett importanti tat-trattament għal stadju tal-iżvilupp huwa stabbilit mill-applikazzjoni rigressiva tat-test ta' Jonckheere-Terpstra applikat għall-medji tal-irreplikati. Inkella, u idealment, għandu jintuża t-test multikwantali ta' Jonckheere mill-20 sat-80 perċentil sabiex jiġi stabbilit l-effett, peress li jieħu f'kunsiderazzjoni bidliet fil-profil tad-distribuzzjoni.

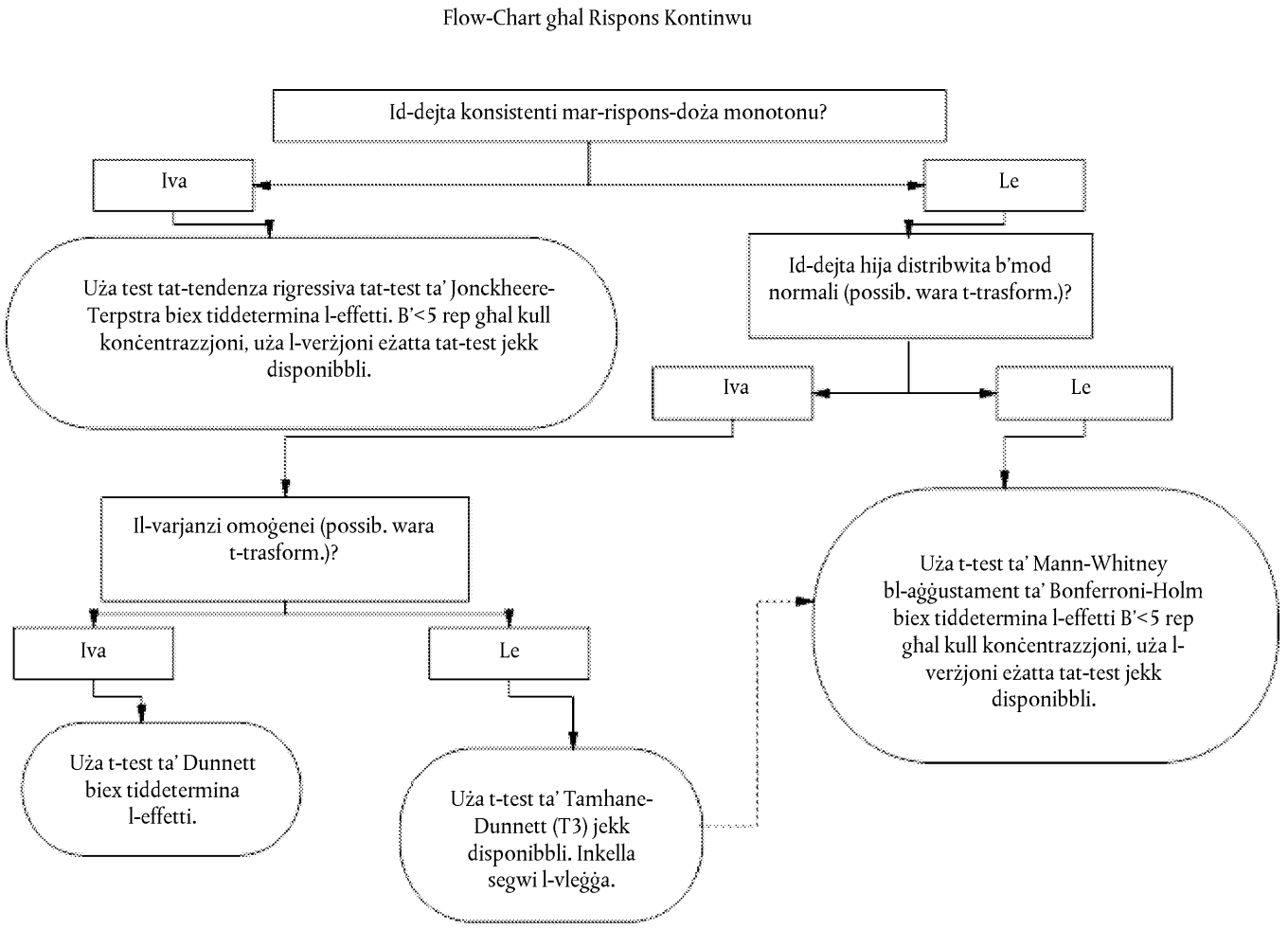
67. L-unità xierqa ta' analiżi hija l-irreplikat sabiex id-dejta tkun tikkonsisti f'medjani tal-irreplikati jekk jintuża t-test ta' Jonckheere-Terpstra jew it-test-U ta' Mann-Whitney, jew il-medji tal-irreplikati jekk jintuża t-test ta' Dunnett. Il-monotoniċità tad-doża-rispons tista' tiġi vvalutata viżwalment mill-medji jew il-medjani tal-irreplikati u t-trattament jew minn testijiet formali bħal dawk deskritti qabel (11). Bi ftit inqas minn ħames irreplikati għal kull trattament jew kontroll, għandhom jintużaw il-verżjonijiet ta' permutazzjoni eżatti tat-testijiet ta' Jonckheere-Terpstra u Mann-Whitney jekk disponibbli. L-importanza statistika tat-testijiet kollha indikati hija ġġudikata fil-livell ta' sinifikanza 0,05.

68. Il-Figura 4 hija flow-chart għat-twettiq ta' testijiet statistiċi fuq dejta kontinwa.

▼M6

Figura 4.

Flow-chart għal approċċi statistiċi għal dejta dwar ir-rispons kontinwu.



02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

Kunsiderazzjonijiet speċjali għall-analiżi tad-dejta

Użu ta' livelli tat-trattament f'riskju

69. Jiġu kkunsidrati bosta fatturi meta jiġi stabbilit jekk irreplikat jew trattament sħiħ jurix tossiċità ċara u għandux jitneħħa mill-analiżi. Tossiċità ċara hija ddefinita bħala > 2 mortalitajiet fi kwalunkwe rreplikat li jistgħu jiġu spjegati biss b'tossiċità u mhux żball tekniku. Sinjali oħrajn ta' tossiċità ċara jinkludu emorraġija, imġiba anormali, xejriet tal-għawn anormali, anoressija u kwalunkwe sinjal kliniku ieħor ta' mard. Għal sinjali subletali ta' tossiċità, jista' jkun hemm bżonn ta' evalwazzjonijiet kwalitattivi, u dejjem għandha ssir referenza għall-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif.

Kontrolli tas-solvent

70. L-użu ta' solvent għandu jiġi kkunsidrat biss bħala l-aħħar rikors, wara li jkunu ġew ikkunsidrati l-għażliet kollha l-oħrajn ta' twassil. Jekk jintuża solvent, f'dak il-każ għandu jsir fl-istess ħin kontroll b'ilma nadif. Fi tmiem it-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent. Dan isir permezz ta' paragun statistiku tal-grupp ta' kontroll tas-solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif. L-iktar punti ta' tmiem relevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analiżi huma l-istadju tal-iżvilupp, l-SVL u l-piż imxarrab, peress li dawn jistgħu jkunu affettwati permezz ta' tossiċitajiet mhux tirojdali. Jekk jinstabu differenzi statistikament importanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif u dak ta' kontroll bis-solvent, sib il-punti ta' tmiem tal-istudju għall-miżuri tar-rispons bl-użu tal-kontroll bl-ilma nadif. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament importanti bejn il-kontroll bl-ilma nadif u l-kontroll bis-solvent għall-varjabbli tar-rispons kollha mkejlin, stabbilixxi l-punti ta' tmiem tal-istudju għall-miżuri tar-rispons bl-użu tal-kontrolli bl-ilma ta' dilwizzjoni u bis-solvent raggruppati.

Gruppi tat-trattament li jilħqu l-istadju 60 u iktar tal-iżvilupp

71. Wara l-istadju 60, l-imrieżeb juru tnaqqis fid-daqs u l-piż minħabba risorbiment tat-tessut u tnaqqis tal-kontenut tal-ilma assolut. B'hekk, il-kejliet tal-piż imxarrab u l-SVL ma jistgħux jintużaw kif xieraq fl-analiżijiet statistiċi għal differenzi fir-rati ta' tkabbir. Għaldaqstant, il-piż imxarrab u d-dejta dwar it-tul mill-organiżmi > NF60 għandhom jiġu ċensurati u ma jistgħux jintużaw fl-analiżijiet tal-medji tal-irreplikati jew il-medjani tal-irreplikati. Jistgħu jintużaw żewġ approċċi differenti sabiex jiġu analizzati dawn il-parametri relatati mat-tkabbir.

72. Approċċ minnhom huwa li jiġu kkunsidrati biss imrieżeb fl-istadju 60 tal-iżvilupp jew inqas għall-analiżijiet statistiċi tal-piż imxarrab u/jew l-SVL. Dan l-approċċ huwa mifhum li jipprovdi informazzjoni robusta biżżejjed dwar is-serjetà tal-effetti possibbli tat-tkabbir diment li sehem żgħir biss mill-annimali tat-test jitneħħew mill-analiżijiet (≤ 20 %). Jekk numru ikbar ta' mrieżeb juru żvilupp lil hinn mill-istadju 60 (≤ 20 %), f'konċentrazzjoni nominali waħda jew iktar, għandha ssir ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta fuq l-imrieżeb kollha sabiex jiġu vvalutati l-effetti tat-tkabbir dovuti għal trattamenti kimiċi filwaqt li jiġi kkunsidrat l-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju fuq it-tkabbir. L-Appendiċi 3 jipprovdi gwida dwar l-analiżi ANOVA b'żewġ fatturi tal-piż u t-tul.

LETTERATURA

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551

(8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

▼**M6**

Appendiċi 1

Tabella 1

Kundizzjonijiet Sperimentali għall-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji fuq 21 jum

Annimal tat-Test		Larva *Xenopus laevis*	
Stadju Inizjali tal-Larva		Stadju 51 ta' Nieuwkoop and Faber	
Perjodu ta' Espożizzjoni		21 jum	
Kriterji tal-Għażla tal-Larva		Stadju tal-iżvilupp u tul totali (mhux obbligatorju)	
Konċentrazzjonijiet tat-test		Minimu ta' 3 konċentrazzjonijiet li jvarjaw bejn wieħed u ieħor ordni wieħed ta' kobor	
Reġim ta' Espożizzjoni		Fluss kontinwu (preferut) u/jew tiġdid statiku	
Rata tal-Fluss tas-Sistema tat-Test		25 ml/min (sostituzzjoni tal-volum sħiħ bejn wieħed u ieħor kull 2,7 siegħa)	
Punti ta' Tmiem Primarji / Jiem tal-Istabbiliment		Mortalità	Kuljum
		Stadju tal-Iżvilupp	J 7 u 21
		Tul tas-Sieq ta' Wara	J 7 u 21
		Tul mill-Imnieħer sal-Anus	J 7 u 21
		Piż tal-Ġisem Imxarrab	J 7 u 21
		Istoloġija tat-Tirojde	J 21
Ilma ta' Dilwizzjoni / Kontroll tal-Laboratorju		Ilma tal-vit deklorinat (iffiltrat għall-karbonju) jew is-sors tal-laboratorju ekwivalenti	
Densità tal-Larva		20 larva / reċipjent tat-test (5 / l)	
Soluzzjoni tat-Test / Reċipjent tat-Test		4-10 l (tal-inqas 10-15 cm ilma) / Reċipjent tat-test tal-ħġieġ jew tal-Azzar Inossidabbli (eż., 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Replikazzjoni		4 reċipjenti tat-test tal-irreplikati / konċentrazzjoni u kontroll tat-test	
Rata ta' Mortalità Aċċettabbli fil-Kontrolli		≤ 10 % għal kull reċipjent tat-test tal-irreplikati	
Fissazzjoni tat-Tirojde	Numru Ffissat	L-imrieżeb kollha (fil-bidu jiġu evalwati 5/irreplikat)	
	Reġjun	Ras jew ġisem sħiħ	
	Fluwidu tal-Fissazzjoni	Fissattiv ta' Davidson	
Tmigħ	Ikel	Sera Micron® jew ekwivalenti	
	Ammont / Frekwenza	Ara t-Tabella 1 għar-reġim tat-tmigħ bl-użu ta' Sera Micron®	
Dawl	Fotoperjodu	12-il siegħa Dawl: 12-il siegħa dlam	

▼**M6**

	Intensità	600 sa 2 000 lux (Imkejlin fil-Wiċċ tal-Ilma)
Temperatura tal-Ilma		22° ± 1 °C
pH		6,5 — 8,5
Konċentrazzjoni ta' Ossiġenu Dissolt (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % Saturazzjoni tal-Arja)
Skeda tal-Kampjun Kimiku Analitiku		Darba / Ġimgħa (4 Avvenimenti tal-Kampjun / Test)

▼**M6**

Appendiċi 2

Tabelli tar-rapportar għad-dejta mhux ipproċessata u d-dejta sommarja

Tabella 1

Informazzjoni ġenerali dwar is-sustanza kimika tat-test

Informazzjoni kimika			
	Daħħal is-sustanza kimika tat-test, l-unitajiet tal-konċentrazzjoni, u t-trattamenti		
	Sustanza kimika tat-test:		
	Unitajiet tal-konċentrazzjoni:		
	Trattament 1		
	Trattament 2		
	Trattament 3		
	Trattament 4		
	Data (jum 0):		Daħħal id-data (xx/jj/ss)
	Data (jum 7):		Daħħal id-data (xx/jj/ss)
	Data (jum 21):		Daħħal id-data (xx/jj/ss)

Tabella 2

Skedi għall-ġbir ta' dejta mhux ipproċessata għall-jiem 7 u 21

JUM X
DATA 00/00/00

	Konċen-trazzjoni	Numru tat-Tratta-ment	Numru tal-Irrepli-kat	Numru tal-indi-vidwu	Identifika-tur tal-In-dividwu	Stadju tal-Iżvilupp	Tul tal-SVL (mm)	Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxar-rab tal-Or-ganiżmu Sħiħ (mg)
RINGIE-LA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Konċen-trazzjoni	Numru tat-Tratta-ment	Numru tal-Irrepli-kat	Numru tal-indi-vidwu	Identifika-tur tal-In-dividwu	Stadju tal-Iżvilupp	Tul tal-SVL (mm)	Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxar-rab tal-Or-ganiżmu Shih (mg)
RINGIE-LA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Konċen-trazzjoni	Numru tat-Tratta-ment	Numru tal-Irrepli-kat	Numru tal-indi-vidwu	Identifika-tur tal-In-dividwu	Stadju tal-Iżvilupp	Tul tal-SVL (mm)	Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxar-rab tal-Or-ganiżmu Shih (mg)
RINGIE-LA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Konċentrazzjoni	Numru tat-Trattament	Numru tal-Irreplikat	Numru tal-individwu	Identifikatur tal-Individwu	Stadju tal-Iżvilupp	Tul tal-SVL (mm)	Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxarrab tal-Organiżmu Shih (mg)
RINGIELA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Tabella 3

Sommarji kkalkolati għad-dejta dwar il-punti ta' tmiem mill-jiem 7 u 21

		Stadju tal-Iżvilupp			SVL (mm)		Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)		Piż (mg)	
TRT	REP	MIN	MEDJAN	MASS	MEDJA	ŻVI STD	MEDJU	ŻVI STD	MEDJU	ŻVI STD
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 2.

Tabella 4

Dejta dwar il-mortalità ta' kuljum

Jum tat-Test	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Jum tat-Test	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Għadd tal-irreplikati		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Għadd tat-Trattament		0				0				0				0			

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 1.

Tabella 5

Kriterji tal-Kwalità tal-Ilma

Sistema ta' Espożizzjoni (bi fluss kontinwu/tiġdid statiku):
Temperatura:
Intensità tad-dawl:
Ċiklu dawl-dlam:
Ikel:
Rata tat-tmiegħ:
pH tal-ilma:
Konċentrazzjoni tal-jodju fl-ilma tat-test:

▼**M6**

Tabella 6

Dejta kimika sommarja

Isem is-Sustanza Kimika:																					
Każ #:																					
Jum tat-Test	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 1.

▼**M6**

Tabella 7

Tabelli għar-rapportar tal-istopatoloġija għall-kriterji ċentrali

Data: Sustanza kimika: Patoloġista:

ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 1	ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 2	Ipertrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Ipertrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplażja taċ-ċelloli follikolari
Total:					

ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1	ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2	Ipertrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Ipertrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplażja taċ-ċelloli follikolari
Total:					

ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1	ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2	Ipertrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Ipertrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplażja taċ-ċelloli follikolari
Total:					

▼**M6**

Tabella 8

Kriterji addizzjonali tal-istopatoloġija

Data: Sustanza kimika: Patoloġista:

ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 1		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 2			
Total:			

Annimal tad-Doża ID — irreplikat 1		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
Annimal tad-Doża ID — irreplikat 2			
Total:			

ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2			
Total:			

ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2			
Total:			

▼**M6**

Tabella 9

Deskrizzjonijiet narrattivi għal sejbiet istopatoloġiċi

Data:

Sustanza kimika:

Patoloġista:

		Deskrizzjoni narrattiva
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 1		
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 2		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2		

▼**M6**

ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2		

▼M6

Tabella 10

Mudell tat-tabella sommarja ta' rapportar għall-jum × (7 jew 21) tal-AMA

		Kontroll				Doża 1					Doża 2					Doża 3				
Punt ta' tmiem	Irreplikat	Medju	SD	CV	N	Medju	SD	CV	N	valur-p	Medja	SD	CV	N	valur-p	Medja	SD	CV	N	valur-p
Sieq ta' Wara Tul (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			
Piż imxarrab (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			

02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 2238

▼M6

Tabella 11

Mudell tat-tabella sommarja ta' rapportar għal dejta dwar l-istadju tal-iżvilupp tal-jum × (7 jew 21) għall-AMA

		Kontroll				Doża 1					Doża 2					Doża 3				
	Irreplikat	Medjan	Min	Mass	N	Medjan	Min	Mass	N	valur-p	Medjan	Min	Mass	N	valur-p	Medjan	Min	Mass	Medjan	valur-p
Stadju tal-Iżvilupp	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			

▼M6

Appendiċi 3

Analiżi alternattiva tal-piż u t-tul fil-każ ta' żvilupp tardiv tal-istadju li jaqbeż l-20 % tal-imrieżeb f'konċentrazzjoni waħda jew iktar

Jekk numru ikbar ta' mrieżeb juru żvilupp lil hinn mill-istadju 60 (≥ 20 %) f'konċentrazzjoni nominali waħda jew iktar, għandha ssir ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta fuq l-imrieżeb kollha biex jiġu vvalutati l-effetti tat-tkabbir minħabba trattamenti kimiċi fil-waqt li jittieħed f'kunsiderazzjoni l-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju fuq it-tkabbir.

Il-proposta hija sabiex tintuża d-dejta kollha iżda jingħata kont lill-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju. Dan jista' jsir b'ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta. Iddefinixxi StadjuTard = "Iva" għal annimal jekk l-istadju tal-iżvilupp tiegħu huwa 61 jew ikbar. Inkella, iddefinixxi StadjuTard = "Le". F'dak il-każ tista' ssir ANOVA b'żewġ fatturi b'konċentrazzjoni u StadjuTard u l-interazzjoni tagħhom, b'fattur għal għarrieda Rep(Conc) u fattur ieħor għal għarrieda Marżebba(Rep). Dan xorta jittratta lir-rep bħala l-unità tal-analiżi u essenzjalment jagħti l-istess riżultati bħala analiżi ponderata tal-medji tar-rep*stadjutard, ponderati bin-numru ta' annimali għal kull medja. Jekk id-dejta tikser ir-rekwiżiti dwar l-omoġenità tal-varjanza jew in-normalità tal-ANOVA, f'dak il-każ tista' ssir trasformazzjoni tal-ordni tal-klassifikazzjoni normalizzata sabiex titneħħa dik l-oġġezzjoni.

Minbarra t-testijiet-F standard tal-ANOVA għall-effetti ta' Konċ, StadjuTard, u l-interazzjonijiet tagħhom, it-test-F tal-interazzjoni jista' jinqasam f'żewġ testijiet-F addizzjonali tal-ANOVA, wieħed fuq ir-risponsi medji fil-konċentrazzjonijiet għal StadjuTard = "Le" u ieħor fuq ir-risponsi medji fuq konċentrazzjonijiet għal StadjuTard = "Iva". Isiru wkoll paraguni oħrajn tal-medji tat-trattament kontra l-kontroll fi ħdan kull livell ta' StadjuTard. Tista' ssir analiżi tat-tip tax-xejra bl-użu tal-kuntrasti xierqa jew jistgħu jsiru paraguni sempliċi bejn il-pari jekk ikun hemm evidenza ta' doża-rispons mhux monotoni fi ħdan livell tal-varjabbli ta' StadjuTard. Aġġustament Bonferroni-Holm għall-valuri-p isir biss jekk it-taqsima-F korrispondenti ma tkunx sinifikanti. Dan jista' jsir fl-SAS u, presumibbilment, f'pakketti ta' software statistiċi oħrajn. Jistgħu jirriżultaw kumplikazzjonijiet meta ma jkun hemm ebda annimali bi stadju tardiv f'ċerti konċentrazzjonijiet, iżda dawn is-sitwazzjonijiet jistgħu jiġu ġestiti b'mod dirett.

▼**M6**

Appendiċi 4

Definizzjonijiet

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M6

C.39. **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-KOLLEMBOLANI FIL-ĦAMRIJA**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 232 tal-OECD (2009). Dan il-metodu ta' ttestjar tfassal sabiex jiġu vvalutati l-effetti tas-sustanzi kimiċi fuq ir-riżultati riproduttivi tal-kollembolani fil-ħamrija. Huwa bbażat fuq proċeduri eżistenti (1) (2). Il-partenoġenetiċi *Folsomia candida* u s-sesswalment riproduttivi *Folsomia fimetaria* huma tnejn mill-iktar speċijiet aċċessibbli ta' Kollembola, u huma kolturabbli u disponibbli fis-suq. Meta jkunu jridu jiġu vvalutati ħabitats speċifiċi mhux koperti miż-żewġ speċijiet, il-proċedura tista' tiġi estiża wkoll għal speċijiet oħrajn ta' Kollembola jekk kapaċi jissodisfaw il-kriterji tal-validità tat-test.

2. Kollembola li jgħixu fil-ħamrija huma speċijiet ekoloġikament relevanti għall-ittestjar ekotossikoloġiku. Il-kollemboli huma esapodi b'eksoskeletru rqiq ferm permeabbli għall-arja u l-ilma, u jirrappreżentaw speċijiet ta' artropodi b'rotta differenti u rata differenti ta' espożizzjoni meta mqabblin mal-ħniex u l-enkitraeidi.

3. Id-densitajiet tal-popolazzjoni tal-Kollembola spiss jilħqu l-10^5 m^{-2} fil-ħamrija u s-saffi ta' skart tal-weraq f'ħafna ekosistemi terrestri (3) (4). L-adulti tipikament ikunu twal 0,5 — 5 mm, il-kontribuzzjoni tagħhom għar-respirazzjoni u l-bijomassa totali tal-annimali tal-ħamrija hija baxxa, stmata bejn 1 % u 5 % (5). Għalhekk, l-iktar rwol importanti tagħhom jista' jkun bħala regolaturi potenzjali tal-proċessi permezz ta' predazzjoni tal-mikrobivori u mikrofawna. L-ispringtails huma annimali tal-priża għal firxa wiesgħa ta' invertebrati endoġeiċi u epiġeiċi, bħal dud, ċentopiedi, brimb, Carabidae u kappillani. Il-Kollembola jikkontribwixxu għall-proċessi ta' dekompożizzjoni f'ħamrija aċiduż fejn jistgħu jkunu l-iktar invertebrati importanti tal-ħamrija minbarra enkitraeidi, peress li normalment il-ħniex u d-diplopodi jkunu niqsin.

4. *F. fimetaria* għandha distribuzzjoni madwar id-dinja u hija komuni f'diversi tipi ta' ħamrija li jvarjaw minn ħamrija mrammla sa raba' kif ukoll ħamrija aċiduż u oħrajn li mhumiex. Hija kollembolan mingħajr għajnejn u bla pigment. Ġiet irreġistrata fil-ħamrija agrikoli madwar l-Ewropa kollha (6). Għandha drawwa ta' ikel omnivoru, inklużi ifa fungali, batterji, protożoa u detrite fl-alimentazzjoni tagħha. Tinteraġixxi permezz ta' ragħha b'infezzjonijiet ta' fungi patoġeniċi tal-pjanti (7) u tista' tinfluwenza l-mikorriża, kif inhu magħruf li huwa l-każ għal F. candida. Bħal ħafna mill-ispeċijiet kollembolani, tirriproduċi sesswalment u teħtieġ il-preżenza permanenti tar-raġel għall-fertilizzazzjoni tal-bajd.

5. *F. candida* hija distribwita madwar id-dinja wkoll. Għad li mhijiex komuni f'ħafna mill-ħamrija naturali, spiss issibha f'numru kbar ħafna f'siti rikki f'ħamrija humus. Hija kollembolan mingħajr għajnejn u bla pigment. Għandha furka żviluppata sew (organu biex taqbeż) u moviment ta' ġiri attiv u taqbeż mill-ewwel meta disturbata. Ir-rwol ekoloġiku ta' *F. candida* jixbah ir-rwol ta' *F. fimetaria*, iżda l-ħabitats huma ħamrija iktar organikament rikki. Tirriproduċi partenoġenetikament. L-irġiel jistgħu jkunu inqas minn 1 f'elf.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Kollembola adulti (*F. fimetaria*) jew żgħar (*F. candida*) sinkroniċi huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallta f'ħamrija artifiċjali mmodifikata (8) bl-użu ta' kontenut ta' materja organika ta' 5 % (jew ħamrija oħra). Ix-xenarju tat-test jista' jinqasam f'żewġ stadji:

— Test tas-sejbien tal-medda, fil-każ li ma jkunx hemm biżżejjed informazzjoni dwar it-tossiċità disponibbli, li fih il-mortalità u r-riproduzzjoni

▼M6

jkunu l-punti ta' tmiem ewlenin ivvalutati wara ġimgħatejn għal *F. fimetaria* u 3 ġimgħat għal *F. candida*.

— Test definittiv tar-riproduzzjoni li fih jiġi vvalutat n-numru totali ta' żgħar prodotti mill-annimali ġenituri u s-sopravivenza tal-annimali ġenituri. It-tul ta' dan it-test definittiv huwa ta' 3 ġimgħat għal *F. fimetaria* jew 4 ġimgħat għal *F. candida*.

L-effett tossiku tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-riżultati tal-mortalità u tar-riproduzzjoni tal-adulti jingħata bħala LC_x u EC_x billi d-dejta titqiegħed f'mudell xieraq permezz ta' rigressjoni mhux lineari biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkaġuna mortalità ta' x % jew tnaqqis fir-riżultat tar-riproduzzjoni, rispettivament, jew inkella bħala l-valur NOEC/LOEC (9).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Preferibbilment għandhom ikunu magħrufa l-karatteristiċi fiżiċi, is-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma ħamrija u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test. Tajjeb li jkun hemm informazzjoni addizzjonali dwar l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija, bħar-rati tal-fotoliżi u idroliżi u d-degradazzjoni bijotika. L-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont in-nomenklatura tal-IUPAC, in-numru tas-CAS, il-lott, il-formula strutturali u l-purità għandha tiġi ddokumentata meta disponibbli.

8. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jista' jintuża għal sustanzi li jinħallu u dawk li ma jinħallux fl-ilma. Madankollu, il-modalità ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ser tvarja skont il-każ. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent ta' partizzjoni arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

VALIDITÀ TAT-TEST

9. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji li ġejjin fil-kontrolli mhux ittrattati sabiex riżultat tat-test jitqies validu:

— Il-mortalità medja fl-adulti ma għandhiex taqbeż l-20 % fi tmiem it-test;

— In-numru medju ta' żgħar għal kull reċipjent għandu jkun tal-inqas 100 fi tmiem it-test;

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni kkalkolat għan-numru ta' żgħar għandu jkun inqas minn 30 % fi tmiem it-test definittiv.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

10. Sustanza kimika ta' referenza għandha tiġi ttestjata fil-konċentrazzjoni EC_{50} tagħha għat-tip ta' ħamrija tat-test magħżul f'intervalli regolari jew inkella possibbilment inkluża f'kull test sabiex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organiżmi tat-test fis-sistema tat-test qiegħed fi ħdan il-livell normali. Sustanza kimika ta' referenza xierqa hija aċidu boriku, li għandu jnaqqas ir-riproduzzjoni b'50 % (10 (11) f'madwar 100 mg/kg piż xott tal-ħamrija għaż-żewġ speċijiet.

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Reċipjenti u tagħmir tat-test

11. Kontenituri li jifilħu 30 g ħamrija niedja huma reċipjenti tat-test xierqa. Il-materjal għandu jkun tal-ħġieġ jew tal-plastik inerti (mhux tossiku). Madankollu, l-użu ta' kontenituri tal-plastik għandu jiġi evitat jekk l-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test tonqos minħabba sorbiment. Ir-reċipjenti tat-test

▼M6

għandu jkollhom żona trażversali li tippermetti sabiex il-fond propju tal-ħamrija fir-reċipjent tat-test ikun 2-4 cm. Ir-reċipjenti għandu jkollhom għotjien (eż. ħġieġ jew polietilen) imfaslin biex inaqqsu l-evaporazzjoni tal-ilma filwaqt li jippermettu li jgħaddu gassijiet bejn il-ħamrija u l-atmosfera. Il-kontenitur għandu jkun tal-inqas parzjalment trasparenti biex ikun jista' jgħaddi d-dawl.

12. Huwa meħtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dawn li ġejjin:

— armadju tat-tnixxif;

— sterjomikroskopju;

— metru tal-pH u metru tad-dawl;

— imwieżen preċiżi xierqa;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni ikunu mgħottija bl-għotjien);

— inkubatur jew kamra żgħira bit-temperatura kkontrollata;

— forċipi jew apparat tal-fluss tal-arja b'irdigħ baxx.

Thejjija tal-ħamrija tat-test

13. Tintuża ħamrija artifiċjali mmodifikata (8) b'kontenut ta' materja organika ta' 5 %. Inkella tista' tintuża ħamrija naturali, peress li l-ħamrija artifiċjali ma tixbaħx lil ħamrija naturali. Il-kompożizzjoni rrakkomandata tal-ħamrija artifiċjali hija kif ġej (ibbażata fuq piżijiet nixfin, imnixxfin għal piż kostanti f'105 °C):

— 5 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u miṫħun fin (daqs ta' partikola ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli);

— 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);

— madwar 74 % ramel industrijali mnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron. L-ammont eżatt ta' ramel jiddependi fuq l-ammont ta' $CaCO_3$ (ara hawn taħt), flimkien għandhom jagħmlu 75 %.

— 1,0 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$, polverizzat, grad analitiku) biex jinkiseb pH ta' 6,0 ± 0,5; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiżdied jiddependi prinċipalment fuq il-kwalità/natura tal-pit (ara Nota 1).

Nota 1: L-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ ser ikun jiddependi mill-komponenti tas-substrat tal-ħamrija u għandu jiġi stabbilit billi titkejjel il-pH tas-subkampjuni tal-ħamrija niedja preinkubata eżatt qabel it-test.*Nota 2:* Huwa rrakkomandat li titkejjel il-pH u jistgħu jitkejlu wkoll il-proprozjon C/N, il-Kapaċità ta' Skambju ta' Katjoni (CEC) u l-kontenut ta' materja organika tal-ħamrija sabiex tkun tista' ssir normalizzazzjoni fi stadju iktar tard u jiġu interpretati aħjar ir-riżultati.*Nota 3:* Jekk meħtieġ, eż. għal skopijiet speċifiċi ta' ttestjar, ħamrija naturali minn siti mhux imniġġsin jistgħu jservu ta' test u/jew substrat tal-koltura wkoll. Madankollu, jekk tintuża ħamrija naturali, għandha tiġi kkaratterizzata tal-inqas skont l-oriġini (sit ta' ġbir), il-pH, is-sawra (distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli), is-CEC u l-kontenut ta' materja organika u għandha tkun ħielsa minn kwalunkwe kontaminazzjoni. Għal ħamrija naturali huwa rakkomandat li tintwera l-adegwatezza tagħha għal test u għall-ilħuq tal-kriterji ta' validità tat-test qabel ma tintuża l-ħamrija f'test definittiv.

▼M6

14. Il-kostitwenti nixfin tal-ħamrija huma mħalltin sew (eż. f'ħallat tal-laboratorju fuq skala kbira). Il-kapjenza massima tal-ilma (WHC) tal-ħamrija artifijali hija stabbilita skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 5. Il-kontenut ta' umdità tal-ħamrija tal-ittestjar għandu jiġi ottimizzat sabiex tinkiseb struttura tal-ħamrija poruża laxka li tippermetti sabiex il-kollembolani jidħlu fil-pori. Normalment, dan uwa bejn 40-60 % tad-WHC massima.

15. Il-ħamrija artifiċjali niexfa tixxarrab minn qabel billi jiżdied biżżejjed ilma dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut finali ta' ilma 2-7 ijiem qabel jibda t-test, sabiex tiġi ekwilibrata/stabbilizzata l-aċidità. Sabiex tiġi stabbilita pH, tintuża taħlita ta' ħamrija u soluzzjoni ta' 1 M klorur tal-potassju (KCl) jew 0,01 M klorur tal-kalċju ($CaCl_2$) fi proporzjon ta' 1:5 (skont l-Appendiċi 6). Jekk il-ħamrija hija iktar aċiduża mill-medda meħtieġa, tista' tiġi aġġustata billi jiżdied ammont xiearq ta' $CaCO_3$. Jekk il-ħamrija hija alkalina wisq, tista' tiġi aġġustata billi jiżdied aċidu inorganiku li ma jagħmilx ħsara lill-kollembolani.

16. Il-ħamrija mxarrba minn qabel tinqasam f'porzjonijiet li jaqblu man-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test (u s-sustanza kimika ta' referenza fejn xieraq) u l-kontrolli użati għat-test. Jiddaħħlu s-sustanzi kimiċi tat-test u jiġi rregolat il-kontenut ta' ilma skont il-paragrafu 24.

Għażla u tħejjija tal-annimali tat-test

17. Il-partenoġenetika *F. candida* hija l-ispeċi rrakkomandata, peress li fir-ring testing tal-metodu ta' ttestjar (11), din l-ispeċi ssodisfat il-kriterji ta' validità għas-sopravivenza ħafna iktar mill-*F. fimetaria*. Jekk tintuża speċi oħra, din trid tissodisfa l-kriterji ta' validità spjegati fil-paragrafu 9. Fil-bidu tat-test, l-annimali għandhom ikunu mitmugħin sew u jkollhom età ta' bejn 23-26 jum għal *F. fimetaria* u 9-12-il jum għal *F. candida*. Għal kull irreplikat, in-numru ta' *F. fimetaria* għandu jkun ta' 10 irġiel u 10 nisa, u għal *F. candida* għandhom jintużaw 10 nisa (ara l-Appendiċi 2 u l-Appendiċi 3). L-annimali sinkroniċi jingħażlu għal għarrieda mid-dixxijiet u l-kundizzjoni tas-saħħa u fiżika tagħhom tiġi vverifikata għal kull lott imdaħħal f'irreplikat. Kull grupp ta' 10/20 individwu jiddaħħal f'kontenitur tat-test magħżul għal għarrieda u jingħażlu n-nisa l-kbar tal-*F. fimetaria* sabiex tiġi żgurata distinzjoni xierqa mill-*F. fimetaria* rġiel.

Tħejjija tal-konċentrazzjonijiet tat-test

18. Jistgħu jintużaw erba' metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: 1) taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija bl-ilma bħala trasportatur, 2) taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija b'solvent organiku bħala trasportatur, 3) taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija bir-ramel bħala trasportatur, jew 4) applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-ħamrija. L-għażla tal-metodu xieraq jiddependi mill-karatteristika tas-sustanza kimika u l-iskop tat-test. B'mod ġenerali, huwa rrakkomandat it-taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija. Madankollu, jistgħu jkunu meħtieġa proċeduri ta' applikazzjoni li huma konsistenti mal-użu prattiku tas-sustanza kimika tat-test (eż. sprejjar tal-formulazzjoni likwida jew l-użu ta' formulazzjonijiet ta' pestiċidi speċjali bħal bċejjeċ żgħar jew tlestija taż-żerriegħa). Il-ħamrija tiġi ttrattata qabel ma jiddaħħlu l-kollembolani, ħlief meta s-sustanza kimika tat-test tiddaħħal f'wiċċ il-ħamrija, il-kollembolani għandhom jitħallew jidħlu fil-ħamrija.

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

19. Soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test titħejja f'ilma dejonizzat fi kwantità biżżejjed għall-irreplikati kollha ta' konċentrazzjoni waħda tat-test. Kull soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test titħallat sew ma' lott ħamrija mxarrba minn qabel qabel ma tiddaħħal fir-reċipjent tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

20. Għal sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma, iżda jinħallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinħall fl-iżgħar volum possibbli ta' solvent

▼M6

xieraq (eż. aċetun) li xorta waħda jiżgura taħlit xieraq tas-sustanza kimika fil-ħamrija u titħallat ma' porzjon tar-ramel kwarzuż meħtieġ. Għandhom jintużaw solventi volatili biss. Meta jintuża solvent organiku, il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test u kontroll addizzjonali negattiv bis-solvent għandu jkun fihom l-istess ammont minimu tas-solvent. Il-kontenituri tal-applikazzjoni għandhom jitħallew mikxufin għal ċertu perjodu biex is-solvent assoċjat mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ikun jista' jevapora, u jiġi żgurat li ma ssir ebda dissipazzjoni tas-sustanza kimika tul dan iż-żmien.

Sustanza kimika tat-test li bilkemm tinħall fl-ilma u f'solventi organiċi

21. Għal sustanzi kimiċi li bilkemm jinħallu fl-ilma u f'solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż, li għandu jkun parti mir-ramel totali mdaħħal fil-ħamrija, jitħallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test sabiex tinkiseb il-konċentrazzjoni mixtieqa tat-test. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiddaħħal fil-ħamrija mxarrba minn qabel u titħallat sew wara li jiddaħħal ammont xieraq ta' ilma dejonizzat sabiex jinkiseb il-kontenut meħtieġ ta' umdità. It-taħlita finali tinqasam bejn ir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jitħejja kontroll xieraq ukoll.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-ħamrija

22. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun pestiċida, jista' jkun xieraq li tiġi applikata fuq wiċċ il-ħamrija billi tiġi sprejjata. Il-ħamrija tiġi ttrattata wara li jiżdiedu l-kollembolani. L-ewwel il-kontenituri tat-test jimtlew bis-substrat tal-ħamrija mxarrba, jiddaħħlu l-annimali u mbagħad jintiżnu l-kontenituri tat-test. Sabiex tiġi evitata kwalunkwe espożizzjoni diretta tal-annimali għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' kuntatt dirett, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata tal-inqas nofs siegħa wara li jiżdiedu l-Kollembola. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi applikata fuq wiċċ il-ħamrija b'mod imqassam tajjeb kemm jista' jkun bl-użu ta' apparat xieraq li jisprejja fuq skala tal-laboratorju li jkun jixbah l-applikazzjoni bi sprej fl-għelieqi. L-applikazzjoni għandha ssir f'temperatura fi ħdan ± 2 °C tal-varjazzjoni u għal soluzzjonijiet milwiema, emulsjonijiet jew dispersjonijiet b'rata ta' applikazzjoni tal-ilma skont ir-rakkomandazzjonijiet tal-valutazzjoni tar-riskju. Ir-rata għandha tiġi vverifikata bl-użu ta' teknika xierqa ta' kalibraġġ. Formulazzjonijiet speċjali bħal bċejjeċ żgħar jew tlestija taż-żerriegħa jistgħu jiġu applikati b'mod konsistenti mal-użu agrikolu. L-ikel jiżdied wara l-isprejjar.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tat-test

23. It-temperatura medja tat-test għandha tkun ta' 20 ± 1 °C b'medda tat-temperatura ta' 20 ± 2 °C. It-test isir f'ċikli ta' dawl-dlam ikkontrollati (idealment 12-il siegħa dawl u 12-il siegħa dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux fiż-żona tar-reċipjenti tat-test.

24. Sabiex tiġi vverifikata l-umdità tal-ħamrija, ir-reċipjenti jintiżnu fil-bidu, fin-nofs u fi tmiem it-test. Telf ta' piż ta' > 2 % tpatti għalih żieda ta' ilma dejonizzat. Ta' min jinnota li t-telf tal-ilma jista' jitnaqqas billi tinżamm umdità għolja tal-arja (> 80 %) fl-inkubatur tat-test.

25. Il-pH għandha titkejjel fil-bidu u fi tmiem kemm it-test ta' sejbien tal-medda kif ukoll fit-test definittiv. Il-kejliet għandhom isiru f'kampjun ta' kontroll wieħed żejjed u kampjun żejjed wieħed mill-kampjuni ta' ħamrija ttrattati (il-konċentrazzjonijiet kollha) imħejjijin u miżmumin bl-istess mod bħall-kolturi tat-test, iżda bla ma jiżdiedu l-kollembolani.

Proċedura u kejliet tat-test

26. Għal kull konċentrazzjoni tat-test, ammont tal-ħamrija tat-test li jikkorrispondi għal 30 g piż frisk jitqiegħed fir-reċipjent tat-test. Jitħejjew ukoll

▼M6

kontrolli tal-ilma, mingħajr is-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża veikolu għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, għandha ssir serje ta' kontroll li jkun fiha l-veikolu waħdu minbarra s-serje tat-test. Il-konċentrazzjoni tas-solvent jew id-dispersiv għandha tkun l-istess bħal dik użata fir-reċipjenti tat-test li fihom is-sustanza kimika tat-test.

27. L-ispringtails individwali jiġu ttrasferiti bir-reqqa f'kull reċipjent tat-test (allokati għal għarrieda fir-reċipjenti tat-test) u jitqiegħdu f'wiċċ il-ħamrija. Għal trasferiment effiċjenti tal-annimali jista' jintuża apparat tal-fluss tal-arja b'ir-digħ baxx. In-numru ta' rreplikati għall-konċentrazzjonijiet tat-test u għall-kontrolli jiddependi mid-disinn tat-test użat. Ir-reċipjenti tat-test jitqiegħdu għal għarrieda fl-inkubatur tat-test u dawn il-pożizzjonijiet jerġgħu jingħażlu għal għarrieda kull ġimgħa.

28. Għat-test tal-*F. fimetaria* għandhom jintużaw għoxrin adult, 10 irġiel u 10 nisa, b'età ta' 23-26 jum għal kull reċipjent tat-test. Fil-jum 21, il-kollembolani jiġu estratti mill-ħamrija u jingħaddu. Għal *F. fimetaria*, is-sessi jiġu diskriminati skont id-daqs fil-lott tal-annimali sinkronizzati użat għat-test. In-nisa huma ferm ikbar mill-irġiel (Ara l-Appendiċi 3)

29. Għat-test tal-*F. candida*, għandhom jintużaw għaxar żgħar b'età ta' 9-12-il jum għal kull reċipjent tat-test. Fil-jum 28, il-kollembolani jiġu estrattati mill-ħamrija u jingħaddu.

30. Bħala sors tal-ikel xieraq, fil-bidu tat-test u wara madwar ġimgħatejn jiżdied ma' kull kontenitur ammont suffiċjenti, eż. 2-10 mg, ta' ħmira mnixxfa u mfarrka tal-furnar, disponibbli fis-suq għal użu domestiku.

31. Fi tmiem it-test, jiġu vvalutati l-mortalità u r-riproduzzjoni. Wara 3 ġimgħat (*F. fimetaria*) jew 4 ġimgħat (*F. candida*), il-kollembolani jiġu estrattati mill-ħamrija tat-test (ara l-Appendiċi 4) u jingħaddu (12). Kollembolan jiġi rreġistrat mejjet jekk ma jinstabx fl-estrazzjoni. Il-metodu ta' estrazzjoni u għadd għandu jiġi vvalidat. Il-validità tinkludi effiċjenza fl-estrazzjoni taż-żgħar ogħla minn 95 %, eż. billi jiżdied numru magħruf fil-ħamrija.

32. Sommarju prattiku u skeda taż-żmien tal-proċedura tat-test huma spjegati fl-Appendiċi 2.

Disinn tat-test

Test ta' sejbien tal-medda

33. Meta jkun hemm bżonn, isir test ta' sejbien tal-medda, pereżempju, b'ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg piż xott ta' ħamrija u żewġ irreplikati għal kull trattament u kontroll. Informazzjoni addizzjonali, minn testijiet b'sustanzi kimiċi simili jew minn tagħrif, dwar il-mortalità jew ir-riproduzzjoni tal-Kollembola, tista' tkun siewja wkoll meta tittieħed deċiżjoni fuq il-medda ta' konċentrazzjonijiet li ser jintużaw fit-test ta' sejbien tal-medda.

34. Id-durata tat-test ta' sejbien tal-medda hija ta' ġimgħatejn għal *F. fimetaria* u 3 ġimgħat għal *F. candida* sabiex jiġi żgurat li ġiet prodotta tqegħida waħda ta' żgħar. Fi tmiem it-test, jiġu vvalutati l-mortalità u r-riproduzzjoni tal-Kollembola. Għandhom jiġu rreġistrati n-numru ta' adulti u l-okkorrenza ta' żgħar.

Test finali

35. Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}), għandhom jiġu ttestjati tnax-il konċentrazzjoni. Huma rrakkomandati minimu ta' żewġ irreplikati għal kull trattament b'konċentrazzjoni tat-test u sitt irreplikati tal-kontroll. Il-fattur ta' spazjar jista' jvarja skont il-mudell tad-doża-rispons.

▼M6

36. Għad-determinazzjoni tal-NOEC/LOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet f'sensiela ġeometrika. Huma rrakkomandati erba' rreplikati għal kull trattament bil-konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jitferrxu b'fattur li ma jaqbiżx il-1,8.

37. Approċċ kombinat jippermetti li jiġu stabbiliti kemm l-NOEC/LOEC kif ukoll l-EC_x. Għal dan l-approċċ kombinat, għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet tat-trattament f'sensiela ġeometrika. Huma rrakkomandati erba' rreplikati għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jitferrxu b'fattur li ma jaqbiżx il-1,8.

38. Jekk ma jiġi osservat ebda effett fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test ta' sejbien tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jista' jsir bħala test tal-limitu, bl-użu ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg u l-kontroll. Test tal-limitu ser jipprovdi l-opportunità li jintwera li ma hemm ebda effett statistikament sinifikanti fil-konċentrazzjoni limitu. Għandhom jintużaw tmien irreplikati kemm għall-ħamrija ttrattata kif ukoll għall-kontroll.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

39. Ir-riżultat tar-riproduzzjoni huwa l-punt ta' tmiem ewlieni (eż. in-numru ta' żgħar prodotti għal kull reċipjent tat-test). L-analiżi statistika, eż. il-proċeduri tal-ANOVA, tqabbel it-trattamenti skont it-test-t ta' Student, it-test ta' Dunnett, jew it-test ta' Williams. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati għal medji tat-trattamenti individwali.

40. In-numru ta' adulti sopravissuti fil-kontrolli mhux ittrattati huwa kriterju ta' validità kbir u għandu jiġi ddokumentat. Bħal fit-test ta' sejbien tal-medda, is-sinjali dannuži kollha l-oħrajn għandhom jiġu rrapportati fir-rapport finali wkoll.

LC_x u EC_x

41. Il-valuri EC_x, inklużi l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % inferjuri u superjuri assoċjati magħhom għall-parametru huma kkalkolati bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa (eż. il-funzjoni loġistika jew Weibull, il-metodu Spearman-Karber trimmjat, jew sempliċi interpolazzjoni). EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja tal-kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC_{50} jew kwalunkwe EC_x oħra, is-sett sħiħ ta' dejta għandu jkun soġġett għal analiżi tar-rigressjoni. LC_{50} normalment tiġi stmata permezz ta' analiżi probit jew analiżi simili li tieħu f'kunsiderazzjoni d-dejta dwar il-mortalità distribwita b'mod binomjali.

NOEC/LOEC

42. Jekk analiżi statistika tkun maħsuba sabiex tistabbilixxi l-NOEC/LOEC, hemm bżonn tal-istatistiki għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu li huma rreplikati). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa skont id-Dokument 54 tal-OECD dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (9). B'mod ġenerali, effetti avversi tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-kontroll huma investigati bl-użu ta' ttestjar tal-ipoteżi fuq naħa waħda b'$p \leq 0,05$.

43. Distribuzzjoni normali u omoġenità tal-varjanza jistgħu jiġu ttestjati bl-użu ta' test statistiku xieraq, eż. it-test ta' Shapiro-Wilk u t-test ta' Levene, rispettivament ($p \leq 0,05$). Jistgħu jsiru analiżi tal-Varjanza Unidirezzjonali (ANOVA)

▼M6

u testijiet multiparaguni sussegwenti. Jistgħu jintużaw testijiet b'bosta paraguni (eż. it-test ta' Dunnett) jew testijiet tax-xejriet rigressivi (eż. it-test ta' Williams) sabiex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi importanti ($p \leq 0,05$) bejn il-kontrolli u l-bosta konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test (għażla tat-test irrakkomandat skont id-Dokument 54 tal-OECD (9)). Inkella, jistgħu jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. test-U-Bonferroni skont it-test tax-xejriet ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) sabiex jiġu stabbiliti l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

44. Jekk sar test tal-limitu (paragun tal-kontroll u trattament wieħed biss) u l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametriku (normalità, omoġenità) huma ssodisfati, ir-risponsi metriċi jistgħu jiġu evalwati mit-test ta' Student (test-t). Jista' jintuża t-test-t tal-varjanza mhux ugwali (test-t ta' Welch) jew test mhux parametriku, bħat-test-U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati.

45. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Rapport tat-test

46. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test

— l-identità tas-sustanza kimika tat-test, il-lott u n-numru tas-CAS, il-purità;

— il-karatteristiċi fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log Kow, is-solubilità fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-kostanti ta' Henry (H) u idealment informazzjoni fuq l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija) jekk disponibbli;

— il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u l-addittivi għandhom jiġu speċifikati jekk ma tiġix ittestjata s-sustanza kimika pura;

Organiżmi tat-test

— identifikazzjoni tal-ispeċijiet u l-fornitur tal-organiżmi tat-test, deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tat-tgħammir u l-medda tal-etajiet tal-organiżmi tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test

— deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura tal-esperiment;

— dettalji dwar it-tħejjija tal-ħamrija tat-test; speċifikazzjoni ddettaljata jekk tintuża ħamrija naturali (l-oriġini, l-istorja, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli, il-pH, il-kontenut ta' materja organika);

— il-kapjenza tal-ilma tal-ħamrija;

— deskrizzjoni tat-teknika użata biex is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata għall-ħamrija;

— il-kundizzjonijiet tat-test: l-intensità tad-dawl, id-durata taċ-ċikli ta' dawl-dlam, it-temperatura;

— deskrizzjoni tar-reġim tat-tmigħ, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati tat-tmigħ;

— il-pH u l-kontenut ta' ilma tal-ħamrija fil-bidu u fi tmiem it-test (kontroll u kull trattament);

— deskrizzjoni ddettaljata tal-metodu ta' estrazzjoni u l-effiċjena tal-estrazzjoni;

▼**M6**

Riżultati tat-test

— in-numru ta' żgħar stabbilit f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;

— in-numru ta' adulti u l-mortalità tagħhom (%) f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;

— deskrizzjoni tas-sintomi fiżjoloġiċi jew patoloġiċi ovvji jew tal-bidliet ċari fl-imġiba;

— ir-riżultati miksuba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;

— il-valuri tal-NOEC/LOEC, LC_x għall-mortalità u l-EC_x għar-riproduzzjoni (l-iktar LC_{50}, LC_{10}, EC_{50}, u EC_{10}) flimkien mal-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 %. Graff tal-mudell adattat użat għall-kalkolu, l-ekwazzjoni tal-funzjoni tiegħu u l-parametri tiegħu (Ara (9));

— l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha siewja sabiex jiġu interpretati r-riżultati;

— is-saħħa tat-test propju jekk isir l-ittestjar tal-ipoteżi (9);

— id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test;

— il-validità tat-test;

— għall-NOEC, meta stmata, id-differenza identifikabbli minima.

LETTERATURA

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388

(5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268

(8) Il-Kapitolu C.36 ta' dan l-Anness, *Test tar-riproduzzjoni tad-Dud Predatorju (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) fil-ħamrija*.

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar (f'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet effettivi kollha jingħataw bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull massa niexfa tal-ħamrija tat-test):

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita.

NOEC (konċentrazzjoni mingħajr effetti osservabbli) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha ma huwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) fi ħdan perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

LOEC (konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) fi ħdan perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbla mal-kontroll.

EC_x (Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organiżmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

Is-sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼**M6**

Appendiċi 2

L-azzjonijiet ewlenin u skeda ta' żmien għat-twettiq ta' test tal-kollembolani

L-istadji tat-test jistgħu jinġabru fil-qosor kif ġej:

Ħin (ġurnata)	Azzjoni
– 23 sa – 26	Tħejjija tal-koltura tal-*F. fimetaria* sinkronika
– 14	Ħejji l-ħamrija artifiċjali (taħlit tal-kostitwenti nixfin) Ivverifika l-pH tal-ħamrija artifiċjali u aġġustaha kif xieraq Kejjel id-WHC mass tal-ħamrija
– 9 sa – 12	Tħejjija tal-koltura tal-*F. candida* sinkronika
– 2 sa – 7	Ħamrija mxarrba minn qabel
– 1	Qassam iż-żgħar f'lottijiet Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin u applika s-sustanza kimika tat-test jekk hemm bżonn ta' solvent
0	Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin u applika s-sustanza kimika tat-test jekk hija sustanza kimika solida, tinħall fl-ilma jew hemm bżonn ta' applikazzjoni fuq il-wiċċ. Kejjel il-pH tal-ħamrija u iżen il-kontenituri. Żid l-ikel. Daħħal il-kollembolani.
14	Test ta' sejbien tal-medda tal-*F. fimetaria*: Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-ħamrija u t-telf ta' ilma (piż) Testijiet definittivi: Kejjel il-kontenut tal-umdità u erġ'imla l-ilma u żid 2-10 mg ħmira
21	Test definittiv tal-*F. fimetaria*: Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-ħamrija u t-telf ta' ilma (piż) Sejbien tal-medda tal-*F. candida*: Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-ħamrija u t-telf ta' ilma (piż)
28	Test definittiv tal-*F. candida*: Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-ħamrija u t-telf ta' ilma (piż)

▼M6

Appendiċi 3

Gwida dwar it-trobbija u s-sinkronizzazzjoni ta' *F. fimetaria* u *F. candida*

Iż-żmien u d-durati mogħtijin f'din il-gwida għandhom jiġu vverifikati għal kull razza ta' kollembolani speċifiċi sabiex jiġi żgurat li t-twaqqit ikun biżżejjed għal żgħar sinkronizzati biżżejjed. Bażikament, l-inċidenza tal-ovipożizzjoni wara li l-adulti jiġu ttrasferiti għal substrat frisk u t-tifqis tal-bajd jiddetermina l-jum xieraq għall-ġbir tal-bajd u l-ġbir ta' żgħar sinkroniċi.

Huwa rrakkomandat li wieħed ikollu koltura permanenti ta' stokk li tikkonsisti f', eż., 50 kontenitur/dixx Petri. Il-koltura tal-istokk għandha tinżamm f'kundizzjoni tajba ta' tmigħ permezz ta' tmigħ, tisqija u tneħħija ta' ikel u karkassi qodma. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed kollembolani fis-substrat jista' jkun hemm inibizzjoni minħabba tkabbir fungali msaħħaħ. Jekk il-koltura tal-istokk tintuża spiss wisq għall-produzzjoni tal-bajd, il-koltura tista' tgħeja. Sinjali ta' għeja huma adulti mejtin u moffa fuq is-substrat. Il-bajd li jifdal mill-produzzjoni ta' annimali sinkroniċi jistgħu jintużaw biex tiġġedded il-koltura.

F'koltura sinkronika tal-*F. fimetaria*, issir distinzjoni bejn l-irġiel u n-nisa, primarjament skont id-daqs. L-irġiel huma ferm iżgħar min-nisa, u l-irġiel jimxu b'rata iktar mgħaġġla min-nisa. L-għażla korretta tas-sess ftit li xejn teħtieġ prattika u tista' tiġi kkonfermata bi spezzjoni mikroskopika taż-żona ġenitali (13).

1. **Trobbija**

1.a. *Tħejjija tas-substrat tal-koltura*

Is-substrat tal-koltura huwa materjal tal-kisi ta' Pariġi (sulfat tal-kalċju) b'karbonju attivat. Dan jipprovdi substrat niedi, bil-funzjoni li l-karbonju jassorbi gassijiet ta' skart u eskreti (14) (15). Jistgħu jintużaw forom differenti ta' karbonju biex jiġu ffaċilitati osservazzjonijiet tal-Kollembola. Pereżempju, jintuża karbonju mitħuna għal *F. candida* u *F. fimetaria* (li jipproduċi materjal tal-kisi iswed/griż ta' Pariġi):

Kostitwenti tas-substrat:

— 20 ml karbonju attivat

— 200 ml ilma distillat

— 200 ml materjal tal-kisi ta' Pariġi

jew

— 50 g karbonju mitħun attivat

— 260-300 ml ta' ilma distillat

— 400 g materjal tal-kisi ta' Pariġi.

It-taħlita tas-substrat titħalla toqgħod qabel tintuża.

1.b. *Tgħammir*

Il-kollembolani jinżammu f'kontenituri bħal dixxijiet Petri (90 mm × 13 mm), bil-qiegħ miksi b'saff ta' 0,5 cm substrat tal-karbonju/ materjal tal-kisi. Huma kkolturati f'20 ± 1 °C f'ċiklu ta' dawl-dlam ta' 12-12-il siegħa (400-800 Lux). Il-kontenituri jridu jinżammu mxarrbin il-ħin kollu billi jiġi żgurat li l-umdità tal-arja fi ħdan il-kontenituri tkun ta' 100 %. Dan jista' jiġi ggarantit bil-preżenza ta' ilma ħieles fi ħdan il-materjal tal-kisi poruż, iżda tiġi evitata l-ġenerazzjoni ta' rita tal-ilma fuq wiċċ il-materjal tal-kisi. It-telf

▼**M6**

ta' ilma jista' jiġi evitat billi tiġi pprovduta arja ambjentali umda. Kwalunkwe individwu mejjet għandu jitneħħa mill-konteniturі, kif ukoll kwalunkwe ikel immuffat. Biex tiġi stimolata l-produzzjoni ta' bajd, hemm bżonn li l-annimali adulti jitqiegħdu f'dixxijiet Petri b'materjal tal-kisi ta' Pariġi ppreparat ġdid/substrat tal-karbonju.

1.c. *Sors tal-ikel*

Tintuża ħmira mnixxfa u mitħuna tal-furnar bħala l-unika provvista ta' ikel kemm għal *F. candida* kif ukoll *F fimetaria*. Ikel frisk jiġi pprovdut darba jew darbtejn fil-ġimgħa, sabiex tiġi evitata l-moffa. Jitqiegħed eżatt fuq il-materjal tal-kisi ta' Pariġi f'munzell żgħir. Il-massa tal-ħmira tal-furnar miżjuda għandha tiġi aġġustata għad-daqs tal-popolazzjoni tal-kollembolani, iżda bħala regola ġenerali 2-15-il mg huma biżżejjed.

2. **Sinkronizzazzjoni**

It-test għandu jsir b'annimali sinkronizzati sabiex jinkisbu annimali tat-test omoġeni tal-istess instar u daqs. Barra minn hekk, is-sinkronizzazzjoni tippermetti d-diskriminazzjoni tal-*F. fimetaria* rġiel u nisa mill-età ta' 3 ġimgħat 'il quddiem fuq il-bażi ta' dimorfiżmu sesswali, jiġifieri differenzi fid-daqs. Il-proċedura ta' hawn taħt hija suġġeriment fuq kif jinkisbu annimali sinkronizzati (l-istadji prattiċi mhumiex obbligatorji).

2.a. *Sinkronizzazzjoni.*

— Ħejji l-kontenituri b'saff ta' 0,5 cm ta' materjal tal-kisi ta' Pariġi/substrat tal-karbonju.

— Meta jiġu biex ibidu, ittrasferixxi 150-200 *F. fimetaria* adult u 50-100 *F. candida* mill-aħjar 15-20 kontenitur tal-koltura tal-istokk b'substrat ta' 4-8 ġimgħat għall-kontenituri u itmagħhom 15-il mg ħmira tal-furnar. Evita milli tinkludi liż-żgħar flimkien mal-adulti peress li l-preżenza taż-żgħar tista' tinibixxi l-produzzjoni tal-bajd.

— Żomm il-koltura f'20 ± 1 °C (il-medja għandha tkun ta' 20 °C) u ċiklu ta' dawl-dlam ta' 12-12-il siegħa (400-800 Lux). Ara li jkun hemm ikel frisk disponibbli u l-arja hija saturata bl-ilma. Nuqqas ta' ikel jista' jwassal sabiex l-annimali jneħħu l-ħmieġ fuq il-bajd, u dan jirriżulta fi tkabbir fungali fuq il-bajd jew inkella l-*F. candida* jistgħu jikkannibalizzaw il-bajd tagħhom stess. Wara 10 ijiem, il-bajd jinġabar bir-reqqa b'labra u spatula u jitqiegħed f'"karti tal-bajd" (biċċiet żgħar ta' karta filtru mxappa fil-materjal tal-kisi ta' Pariġi/sospensjoni magħquda tal-karbonju) li jitqiegħdu f'kontentur b'substrat ta' materjal tal-kisi frisk/-substrat tal-karbonju). Jiżdiedu ftit ħbub tal-ħmira mas-substrat sabiex jiġu attirati ż-żgħar u jkollhom jitilqu mill-karti tal-bajd. Importanti li l-karti tal-bajd u s-substrat jibqgħu umdi, jew inkella l-bajd jiġi deidratat. Inkella, l-annimali adulti jistgħu jitneħħew mill-kaxex tal-koltura tas-sinkronizzazzjoni wara li jipproduċu l-bajd għal jumejn jew tlieta.

— Wara tliet ijiem, ħafna mill-bajd fuq il-karti tal-bajd ser ikun faqqas, u wħud miż-żgħar jistgħu jispiċċaw taħt il-karti tal-bajd.

— Biex ikun hemm żgħar b'età ndaqs, il-karti tal-bajd b'bajd li ma faqqasx jitneħħew mid-dixx Petri bil-forċipi. Iż-żgħar, issa 0-3 ijiem, jibqgħu fid-dixx u jintemgħu ħmira tal-furnar. Il-bajd li ma jfaqqasx jintrema.

— Il-bajd u ż-żgħar li faqqsu jiġu kkolturati bl-istess mod bħall-adulti. B'mod partikolari għall-*F. fimetaria*, għandhom jittieħdu l-miżuri li ġejjin: żgurar li jkun hemm biżżejjed ikel frisk, jitneħħa l-ikel qadim li qed jimmoffa, wara ġimgħa ż-żgħar jitqassmu f'dixxijiet Petri ġodda diment li d-densità tkun ta' iktar minn 200.

▼**M6**

2.b. *Ġestjoni tal-kollembolani fil-bidu tat-test*

— *F. candida* b'età ta' 9-12-il jum jew il-*F. fimetaria* b'età ta' 23-26 jum jinġabru, eż. b'irdigħ, u jinħelsu f'kontenitur żgħir b'materjal tal-kisi mxarrab/substrat tal-karbonju u l-kundizzjoni fiżika tagħhom tiġi vverifikata taħt il-mikroskopju binokulari (annimali li korrew u li weġġgħu jitneħħew). Il-passi kollha għandhom jittieħdu filwaqt li l-kollembolani jinżammu f'atmosfera niedja biex jiġi evitat stress minn nixfa, eż. billi jintużaw uċuħ imxarrbin eċċ.

— Dawwar il-kontenitur minn fuq għal isfel u taptap fuqu biex tittrasferixxi l-kollembolani fil-ħamrija. Elettriku statiku għandu jiġi newtralizzat, inkella l-annimali jaf jaqbdu u jtiru fl-arja, jew jeħlu mal-ġenb tal-kontenitur tat-test u jinxfu. Għal newtralizzazzjoni jistgħu jintużaw jonizzatur jew biċċa niedja taħt il-kontenitur.

— L-ikel għandu jitferrex fuq il-wiċċ kollu tal-ħamrija u mhux biss f'munzell wieħed.

— Matul it-trasportar u matul il-perjodu ta' ttestjar, għandhom jiġu evitati daqqiet jew disturb fiżiku ieħor fuq il-kontenituri tat-test, peress li dan jista' jżid l-kompattar tal-ħamrija, u jxekkel l-interazzjoni bejn il-kollembolani.

3. **Speċijiet ta' Kollembolani alternattivi**

Jistgħu jingħażlu speċijiet ta' kollembolani oħrajn għall-ittestjar skont dan il-metodu ta' ttestjar bħal Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta. L-ewwel iridu jiġu ssodisfati numru ta' prerekwiżiti qabel ma jintużaw speċijiet alternattivi:

— Għandhom jiġu identifikati bla ekwivoki;

— Għandha tiġi spjegata l-motivazzjoni wara l-għażla tal-ispeċijiet;

— Għandu jiġi żgurat li l-bijoloġika riproduttiva tkun inkluża fil-fażi tal-ittestjar sabiex tkun mira potenzjali matul l-espożizzjoni;

— Il-ġrajja għandha tkun magħrufa: l-età tal-maturità, id-durata tal-iżvilupp tal-bajd, u l-instars soġġetti għal espożizzjoni;

— Il-kundizzjonijiet ottimali għat-tkabbir u r-riproduzzjoni għandhom jiġu pprovduti mis-substrat tat-test u l-provvista tal-ikel;

— Il-varjabbiltà għandha tkun baxxa biżżejjed biex tinħareġ stima preċiża u eżatta tat-tossiċità.

▼M6

Appendiċi 4

Estrazzjoni u għadd tal-annimali

1. **Jistgħu jintużaw żewġ metodi ta' estrazzjoni.**

1.a. L-ewwel metodu: Jista' jintuża estrattur tal-gradjent bit-temperatura kkontrollata bbażat fuq il-prinċipji minn MacFadyen (1). Is-sħana li ġejja minn element tat-tisħin fil-quċċata tal-kaxxa ta' estrazzjoni (irregolata minn termistur imqiegħed fuq wiċċ il-kampjun tal-ħamrija). It-temperatura fil-likwidu mkessaħ madwar ir-reċipjent miġbur huwa rregolat permezz ta' termistur li jinsab fil-wiċċ tal-kaxxa tal-ġbir (imqiegħda taħt il-qalba tal-ħamrija). It-termisturi huma mqabbdin ma' unità ta' kontroll programmabbli li jżid it-temperatura skont skeda pprogrammata minn qabel. L-annimali jinġabru fil-kaxxa ta' ġbir imkessħa (2 °C) b'saff tal-qiegħ tal-materjal tal-kisi ta' Pariġi/karbonju. L-estrazzjoni tinbeda f'25 °C u t-temperatura tiżdied b'5 °C b'mod awtomatiku kull 12-il siegħa u għandha durata totali ta' 48 siegħa. Wara 12-il siegħa f'40 °C l-estrazzjoni tkun lesta.

1.b. It-tieni metodu: Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni sperimentali, in-numru ta' Kollembola żgħar jiġi vvalutat biż-żamma fil-wiċċ. Għal dan il-għan, it-test isir fir-reċipjenti b'volum ta' bejn wieħed u ieħor 250 ml. Fi tmiem it-test, jiddaħħal 200 ml ilma distillat. Il-ħamrija titħawwad bilmod b'pinzell fin biex il-Kollembola jkunu jistgħu jżommu f'wiċċ l-ilma. Jista' jiżdied ammont żgħir, madwar 0,5 ml, ta' kolorant fotografiku Kentmere mal-ilma biex jgħin fl-għadd billi jżid il-kuntrast bejn l-ilma u l-Kollembola bojod. Il-kolorant mhuwiex tossiku għall-Kollembola.

2. **L-għadd:**

L-għadd tal-kwantità jista' jsir bl-għajnejn jew taħt mikroskopju ħafif bl-użu ta' grilja mqiegħda fuq ir-reċipjent taż-żamma fil-wiċċ jew permezz ta' ritratt tal-wiċċ ta' kull reċipjent u billi wara jingħaddu l-Kollembola fuq ritratti stampati kbar jew slides tal-projjettur. L-għadd jista' jsir ukoll bl-użu ta' tekniki ta' pproċessar ta' immaġnijiet diġitali (12). It-tekniki kollha għandhom jiġu vvalidati.

▼**M6**

Appendiċi 5

Determinazzjoni tad-WHC massima tal-ħamrija

Instab li l-metodu li ġej sabiex tiġi stabbilita l-kapjenza massima tal-ilma (WHC) tal-ħamrija huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (Kwalità tal-Ħamrija — Effetti tas-sustanzi niġġiesa fuq il-ħniex (*Eisenia fetida*). Parti 2: Determinazzjoni tal-effetti fuq ir-riproduzzjoni).

Iġbor kwantità definita (eż. 5 g) tas-substrat tal-ħamrija tat-test billi tuża apparat tal-kampjunar xieraq (tubu trapan eċċ.). Għatti qiegħ it-tubu b'biċċa mxarrba ta' karta filtru u mbagħad qiegħdu fuq xtilliera f'banjumarija. It-tubu għandu jitgħaddas b'mod gradwali sakemm il-livell tal-ilma jkun fuq wiċċ il-ħamrija. Imbagħad għandu jitħalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-ħamrija jista' jinżamm, il-kampjun tal-ħamrija għandu jitħalla jitbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi t-tubu jitqiegħed fuq medda ramel kwarzuż mitħun fin u mxarrab ħafna li jinsab f'reċipjent mgħotti (biex jiġi evitat tnixxif). Imbagħad, il-kampjun għandu jintiżen, imnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapjenza tal-ilma (WHC) għandha tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f′ \% ta′ massa niexfa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa niexfa ta' substrat

▼**M6**

Appendiċi 6

Determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija

Il-metodu li ġej sabiex tiġi stabbilita l-pH ta' ħamrija huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija fl-ISO DIS 10390: Kwalità tal-Ħamrija — Stabbiliment tal-pH.

Kwantità ddefinita ta' ħamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-ħamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' ħamrija) f'ħames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku ($CaCl_2$). Is-sospensjoni mbagħad titħallat sew għal ħames minuti u mbagħad titħalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Imbagħad il-pH tal-fażi likwida titkejjel bl-użu ta' metru tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl bl-użu ta' sensiela xieraq ta' soluzzjonijiet ta' bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

▼M6

C.40. **TEST TAT-TOSSIĊITÀ TAĊ-ĊIKLU TAL-ĦAJJA TAL-KIRONOMIDI F'ILMA TAN-NAQAL BL-UŻU TA' ILMA MIŻJUD JEW NAQAL MIŻJUD**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 233 (2010) tal-OECD. Tfassal sabiex jiġu vvalutati l-effetti tal-espożizzjoni tul il-ħajja tas-sustanzi kimiċi fuq id-ditteru tal-ilma ħelu *Chironomus* sp., billi jkopri bis-sħiħ l-ewwel ġenerazzjoni (ġenerazzjoni P) u l-parti bikrija tat-tieni ġenerazzjoni (ġenerazzjoni F1). Huwa estensjoni tal-metodi ta' ttestjar eżistenti C.28 (1) jew C.27 (15) bl-użu ta' xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma miżjud jew xenarju tan-naqal miżjud, rispettivament. Jieħu f'kunsiderazzjoni l-protokolli eżistenti dwar l-ittestjar tat-tossiċità għal *Chironomus riparius* u *Chironomus dilutus* (qabel imsejħin *C. tentans* (2)) li ġew żviluppati fl-Ewropa u l-Amerika ta' Fuq (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) u li mbagħad sarilhom ringtest (1) (7) (10) (11) (12). Jistgħu jintużaw speċijiet kironomidi oħrajn iddokumentati sew, eż. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Id-durata sħiħa tal-espożizzjoni hija ta' madwar 44 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u –madwar 100 jum għal *C. dilutus*.

2. Kemm ix-xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma kif ukoll dak tan-naqal huma deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. L-għażla ta' xenarju ta' espożizzjoni xieraq jiddependi mill-applikazzjoni maħsuba tat-test. Ix-xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma, b'żieda mal-kolonna tal-ilma, huwa maħsub sabiex jistimola avveniment ta' deriva sprejjata tal-pestiċidi u jkopri l-konċentrazzjoni massima inizjali fl-ilmijiet tal-wiċċ. Iż-żieda mal-ilma hija siewja wkoll għal tipi oħrajn ta' espożizzjoni (inkluż it-tixrid ta' sustanzi kimiċi), iżda mhux għal proċessi ta' akkumulazzjoni fi ħdan in-naqal li jdum iktar mill-perjodu tat-test. F'dak il-każ, u anki meta l-iskol ikun ir-rotta ewlenija ta' dħul ewlenija tal-pestiċidi fil-korpi tal-ilma, disinn ta' naqal miżjud jista' jkun iktar xieraq. Jekk ikun hemm xenarji ta' espożizzjoni oħrajn ta' interess, id-disinn tat-test jista' jiġi adattat malajr. Pereżempju, jekk id-distribuzzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn il-faži tal-ilma u s-saff tan-naqal ma tkunx ta' interess u l-assorbiment fin-naqal irid jiġi minimizzat, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tan-naqal artifiċjali surrogat (eż. ramel kwarzuż).

3. Sustanzi kimiċi li jeħtieġu testijiet ta' organiżmi li jgħixu fin-naqal jistgħu jibqgħu fin-naqal tul perjodi twal. L-organiżmi li jgħixu fin-naqal jistgħu jiġu esposti għal għadd ta' rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni, u ż-żmien meħud għal kull waħda sabiex tikkontribwixxi għall-effett tossiku globali, tiddependi mill-karatteristiċi fiżikokimiċi tas-sustanza kimika. Għal sustanzi kimiċi b'assorbiment qawwi jew għal sustanzi kimiċi b'rabta kovalenti man-naqal, l-inġestjoni ta' ikel ikkontaminat jista' jkun rotta ta' espożizzjoni importanti. Sabiex ma tiġix sottovalutata t-tossiċità ta' sustanzi kimiċi ferm lipofiliċi, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tal-ikel imdaħħal fin-naqal qabel tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 31). Għalhekk, huwa possibbli li jiġu inklużi r-rotot kollha ta' espożizzjoni u l-istadji kollha tal-ħajja.

4. Il-punti ta' tmiem imkejlin huma n-numru totali ta' adulti li jfeġġu (kemm għall-1 ġenerazzjoni kif ukoll għat-2), ir-rata ta' żvilupp (kemm għall-1 ġenerazzjoni kif ukoll għat-2), il-proporzjon tas-sessi tal-adulti li feġġew bis-sħiħ u ħajjin (kemm għall-1 ġenerazzjoni kif ukoll għat-2), in-numru taċ-ċwiemi bajd għal kull mara (l-ewwel ġenerazzjoni biss) u l-fertilità taċ-ċwiemi bajd (l-ewwel ġenerazzjoni biss).

5. Huwa ferm rakkomandat naqal ifformulat. Naqal ifformulat għandu bosta vantaġġi fuq naqal naturali:

▼M6

— il-varjabbiltà sperimentali titnaqqas għaliex tagħmel parti minn "matriċi standardizzat" riproduċibbli u titneħħa l-ħtieġa li jinkiseb naqal nadif mhux ikkontaminat;

— it-testijiet jistgħu jinbdew fi kwalunkwe ħin mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà staġjonali fin-naqal tat-test u ma hemm ebda bżonn ta' pretrattament tan-naqal biex titneħħa fawna indiġena;

— inqas spejjeż meta mqabbel mal-ġbir fuq il-post ta' biżżejjed kwantitajiet għal testijiet ta' rutina;

— in-naqal ifformulat jippermetti li jsiru paraguni tat-tossiċità bejn l-istudji u l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi kif xieraq (3).

6. Id-definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel larva kironomidi instar huma esposti għal medda ta' konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'sistema tal-ilma tan-naqal. It-test jibda billi titqiegħed l-ewwel larva instar (l-ewwel ġenerazzjoni) fil-bekkijiet tat-test li fihom naqal miżjud jew inkella s-sustanza kimika tat-test tiġi miżjuda fl-ilma wara li tiddaħħal il-larva. Jiġu vvalutati l-emerġenza kironomida, iż-żmien sal-feġġa u l-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin. L-adulti li feġġew huma ttrasferiti f'gaġeġ tat-tgħammir, biex jitħaffu l-ġmigħ, it-tgħammir u l-ovipożizzjoni. Jiġu vvalutati n-numru ta' ċwiemi bajd prodotti u l-fertilità tagħhom. Minn dawn iċ-ċwiemi bajd, jinkisbu l-ewwel larva instar tat-tieni ġenerazzjoni. Dawn il-larva jitqiegħdu f'bekkijiet tat-test ippreparati ġodda (il-proċedura ta' żieda bħal dik għall-1 ġenerazzjoni) sabiex tiġi stabbilita l-vijabbiltà tat-2 ġenerazzjoni permezz ta' valutazzjoni tal-feġġa tagħhom, iż-żmien għall-feġġa u l-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin (preżentazzjoni skematika tat-test taċ-ċiklu tal-ħajja hija pprovduta fl-Appendiċi 5). Id-dejta kollha tiġi analizzata jew permezz ta' mudell ta' rigressjoni sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkaġuna tnaqqis ta' X % fil-punt ta' tmiem relevanti, jew bl-użu ta' ttestjar tal-ipoteżi sabiex tiġi stabbilita Konċentrazzjoni Mingħajr Effetti Osservabbli (NOEC). Din tal-aħħar teħtieġ paragun tar-risponsi għat-trattament bir-risponsi ta' kontroll xierqa bl-użu ta' testijiet statistiċi. Ta' min jinnota li fix-xenarju tal-ilma miżjud, fil-każ ta' sustanzi kimiċi b'degradazzjoni veloċi, l-istadji tal-ħajja aħħarin ta' kull ġenerazzjoni (eż. il-fażi ta' pupa) jistgħu jkunu esposti għal livell ta' konċentrazzjoni konsiderevolment inqas fl-ilma tal-madwar milli fl-ewwel larva instar. Jekk dan huwa ta' ħassib, u hemm bżonn ta' livell ta' espożizzjoni paragunabbli għal kull stadju tal-ħajja, jistgħu jiġu kkunsidrati l-emendi li ġejjin tal-metodu ta' ttestjar:

— serje parallela b'żidiet fi stadji differenti tal-ħajja, jew

— żidiet ripetuti (jew tiġdid tal-ilma tal-madwar) tas-sistema tat-test matul iż-żewġ fażijiet ta' ttestjar (l-ewwel u t-tieni ġenerazzjonijiet), filwaqt li l-intervalli taż-żidiet (tiġdid) għandhom jiġu aġġustati għall-karatteristiċi tal-eżitu tas-sustanza kimika tat-test.

It-tali emendi huma fattibbli biss fix-xenarju tal-ilma miżjud, iżda mhux fix-xenarju bin-naqal miżjud.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

8. Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar u l-log K_{ow} tagħha, għandha tkun magħrufa l-partizzjoni mkejla jew ikkalkolata fin-naqal u l-istabbiltà fl-ilma u n-naqal. Għandu jkun hemm disponibbli metodu analitiku affidabbli biex tiġi kkwantifikata s-sustanza kimika tat-test fl-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal bi preċiżjoni

▼M6

u limitu ta' detezzjoni magħrufin u rrapportati. Informazzjoni siewja tinkludi l-formula strutturali u l-purità tas-sustanza kimika tat-test. L-eżitu kimiku tas-sustanza kimika tat-test (eż. dissipazzjoni, degradazzjoni abijotika u bijotika, eċċ.) huwa siewi wkoll. F'(16) hija pprovduta gwida ulterjuri għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi bi karatteristiċi fiżikokimiċi li jagħmluhielhom diffiċli biex isirilhom it-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

9. Is-sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jiġu ttestjati b'mod perjodiku bħala mezz sabiex jiġi żgurat li s-sensittività tal-popolazzjoni tal-laboratorju ma nbidlitx. Bħal bid-dafnidi, biżżejjed li jsir test akut fuq 48 siegħa (skont 17). Madankollu, sakemm ikun hemm linja gwida akuta vvalidata disponibbli, jista' jiġi kkunsidrat test skont il-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness. Eżempji ta' tossikanti ta' referenza użati b'suċċess fir-ringtests u studji ta' validazzjoni huma: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, klorur tal-kadmju u klroru tal-potassju. (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITÀ TAT-TEST

10. Sabiex it-test ikun validu, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— il-feġġa medja fit-trattament tal-kontroll għandha tkun tal-inqas 70 % fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni għaż-żewġ ġenerazzjonijiet (1) (7);

— għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, 85 % tal-insetti adulti totali li feġġew mit-trattament tal-kontroll fiż-żewġ ġenerazzjonijiet għandha sseħħ bejn il-jum 12 u 23 wara t-tidħil tal-ewwel larva instar fir-reċipjenti; għal *C. dilutus*, huwa aċċettabbli perjodu ta' 20 sa 65 jum;

— il-proporzjon medju tas-sessi tal-adulti li feġġew kompletament u ħajjin (bħala frazzjoni ta' nisa jew irġiel) fit-trattament tal-kontroll taż-żewġ ġenerazzjonijiet għandu jkun tal-inqas 0,4, iżda ma jaqbiżx iż-0,6;

— għal kull gaġġa tat-tgħammir, in-numru ta' ċwiemi bajd fil-kontrolli tal-ewwel ġenerazzjoni għandu jkun tal-inqas 0,6 għal kull mara miżjuda fil-gaġġa tat-tgħammir;

— il-frazzjoni taċ-ċwiemi bajd fertili f'kull gaġġa tat-tgħammir tal-kontrolli tal-ewwel ġenerazzjoni għandha tkun tal-inqas 0,6;

— fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni għaż-żewġ ġenerazzjonijiet, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandhom jitkejlu f'kull reċipjent. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun tal-inqas 60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV ([1])), u l-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun bejn 6 u 9 fir-reċipjenti tat-test kollha;

— it-temperatura tal-ilma ma għandhiex tvarja b'iktar minn ± 1,0 °C.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Reċipjenti tat-test u gaġeġ tat-tgħammir

11. Il-larva hija esposta f'bekki tal-ħġieġ ta' 600 ml b'dijametru ta' madwar 8,5 cm (ara l-Appendiċi 5). Reċipjenti oħrajn huma xierqa, iżda għandhom jiggarantixxu fond tal-ilma tal-madwar u n-naqal. Il-wiċċ tan-naqal għandu jkun biżżejjed sabiex jingħataw 2 sa 3 cm^2 għal kull larva. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal għall-fond tal-ilma tal-madwar

([1]) F'20 °C taħt pressjoni atmosferika standard, l-ASV fl-ilma ħelu huwa ta' 9,1 mg/l (60 % isarraf f'5,46 mg/l)

▼M6

għandu jkun ta' madwar 1:4. Bħala minimu għandhom jintużaw gaġeġ tat-tgħammir (tal-inqas 30 cm fit-tliet dimensjonijiet kollha kemm huma) b'xibka tal-wajer (daqs tax-malja madwar 1 mm) fin-naħa ta' fuq u fil-ġenb tal-gaġġa (ara l-Appendiċi 5). F'kull gaġġa jitqiegħed dixx kristallizzanti ta' 2 l, li fih ilma u naqal tat-test, għal ovipożizzjoni. Anki għad-dixx kristallizzanti, il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal għall-fond tal-ilma tal-madwar għandu jkun ta' madwar 1:4. Wara li ċ-ċwiemi bajd jinġabru mid-dixx kristallizzanti, jitqiegħdu fi platt mikrotiter bi 12-il toqba (ċima waħda għal kull toqba li fiha tal-inqas 2,5 ml ilma mid-dixx kristallizzanti miżjud) u wara dan il-platti jitgħattew b'għatu biex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. Jistgħu jintużaw ukoll reċipjenti oħrajn xierqa sabiex jinżammu ċ-ċwiemi bajd. Bl-eċċezzjoni tal-platti tal-mikrotiter, ir-reċipjenti kollha tat-test u l-apparati kollha l-oħrajn li ser jidħlu f'kuntatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament interi ieħor (eż. Politetrafluworoetilen).

Għażla tal-ispeċijiet

12. Idealment, l-ispeċi li għandha tintuża fit-test hija *Chironomus riparius*. Tista' tintuża *C. yoshimatsui*. Tista' tintuża *C. dilutus* ukoll iżda diffiċli timmaniġġjaha u teħtieġ perjodu ta' ttestjar itwal. Id-dettalji dwar il-metodi tal-koltura jingħataw fl-Appendiċi 2 għal *C. riparius*. Hemm informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet tal-koltura disponibli għal *C. dilutus* (5) u *C. yoshimatsui* (14). L-identifikazzjoni tal-ispeċi għanda tiġi kkonfermata qabel l-ittestjar iżda mhijiex meħtieġa qabel kull test jekk l-organiżmi jkunu ġejjin minn koltura meħuda mil-laboratorju stess.

Naqal

13. Idealment għandu jintuża naqal ifformulat (imsejjaħ ukoll naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Madankollu, jekk jintuża naqal naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (tal-inqas il-pH, il-kontenut ta' karbonju organiku, l-istabbiliment ta' parametri oħrajn bħall-proporzjon C/N u l-granulometrija huma rrakkomandati wkoll) u għandu jkun ħieles minn kwalunkwe kontaminazzjoni u organiżmu ieħor li jista' jikkompeti mal-larva kironomida jew jikkonsmaha. Qabel l-ittestjar huwa rrakkomandat ukoll li n-naqal jiġi kkondizzjonat għal sebat ijiem fil-kundizzjonijiet tat-test. In-naqal ifformulat li ġej, kif deskritt f'(1), huwa rrakkomandat (1) (20) (21):

a. 4-5 % pit (piż xott): qrib pH 5,5 sa 6,0 kemm jista' jkun; importanti li jintuża pit f'forma ta' trab, miħun fin (daqs tal-partikoli ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja biss;

b. 20 % tafal tal-kawlina (piż xott) (idealment il-kontenut tal-kawlina jkun iktar minn 30 %);

c. 75-76 % ramel kwarzuż (piż xott) (ir-ramel fin għandu jkun predominanti b'iktar minn 50 fil-mija tal-partikoli bejn 50 u 200 μm);

d. Jiddaħħal ilma dejonizzat sabiex tinkiseb umdità tat-taħlita finali fil-medda ta' 30–50 %;

e. Il-karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura ($CaCO_3$) jiżdied sabiex tiġi aġġustata l-pH tat-taħlita finali tan-naqal għal 7,0 ± 0,5;

f. Il-kontenut tal-karbonju organiku tat-taħlita finali għandu jkun ta' 2 % (± 0,5 %) u jrid jiġi aġġustat billi jintużaw l-ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

14. Is-sors tal-pit, it-tafal tal-kawlina u r-ramel għandu jkun magħruf. Il-komponenti tan-naqal għandhom jiġu kkontrollati sabiex jiġi żgurat li

▼M6

ma hemmx kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti tal-organokloru, komposti organofosforuži). Eżempju għat-tħejjija tan-naqal iffrmulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-taħlit tal-kostitwenti nixfin huwa aċċettabbli wkoll jekk jintwera li wara ż-żieda tal-ilma tal-madwar ma sseħħx separazzjoni tal-kostitwenti tan-naqal (eż. partikoli tal-pit li jżommu fil-wiċċ), u li l-pit jew in-naqal huwa kkondizzjonat biżżejjed.

Ilma

15. Kwalunkwe ilma li jikkonforma mal-karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli kif elenkat fl-Appendiċijiet 2 u 4 huwa xieraq bħala ilma tat-test. Kwalunkwe ilma xieraq, ilma naturali (ilma tal-wiċċ jew ta' taħt l-art), ilma rikostitwit (ara l-Appendiċi 2) jew ilma tal-vit deklorinat huma aċċettabbli bħala ilma tal-koltura u ilma tat-test, jekk il-kironomidi jgħixu fih mingħajr ma juru sinjali ta' stress sakemm jitlestew il-koltura u t-testijiet. Fil-bidu tat-test, il-pH tal-ilma tat-test għandha tkun ta' bejn 6 u 9 u l-ebusija totali mhijiex ikbar minn 400 mg/l bħala $CaCO_3$. Madankollu, jekk hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija u s-sustanza kimika tat-test, għandu jintuża l-ilma tal-ebusija inferjuri (u b'hekk, f'din is-sitwazzjoni ma għandux jintuża l-Elendt Medium M4). L-istess tip ta' ilma għandu jintuża tul l-istudju kollu. Il-karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma elenkati fl-Appendiċi 4 għandhom jitkejlu tal-inqas darbtejn fis-sena jew meta jkun hemm suspett li dawn il-karatteristiċi setgħu nbidlu ħafna.

Soluzzjonijiet ewlenin — Ilma miżjud

16. a. Il-konċentrazzjonijiet tat-test huma kkalkolati fuq il-bażi tal-konċentrazzjonijiet tal-kolonna tal-ilma, jiġifieri l-ilma ta' fuq in-naqal. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin normalment jitħejjew b'dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Idealment is-soluzzjonijiet ewlenin jitħejjew billi tiġi dissolta s-sustanza kimika tat-test fl-ilma tat-test. L-użu ta' solventi jew dispersivi jista' jkun meħtieġ f'ċerti każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Eżempji ta' solventi xierqa huma aċetun, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetileter, dimetilformamid u trietilen glikol. Id-dispersivi li jistgħu jintużaw huma Cremophor RH40, Tween 80, metilċelluloża 0,01 % u HCO-40. Il-konċentrazzjoni tal-aġent solubilizzanti fil-midjum tat-test finali għandha tkun minima (jiġifieri ≤ 0,1 ml/l) u għandha tkun l-istess fit-trattamenti kollha. Meta jintuża aġent solubilizzanti, ma għandu jkollu ebda effett importanti fuq is-sopravivenza kif muri minn kontroll bis-solvent meta mqabbel ma' kontroll negattiv (bl-ilma). Madankollu, għandu jsir kull sforz sabiex jiġi evitat l-użu tat-tali materjali.

Soluzzjonijiet ewlenin — Naqal miżjud

16. b. In-naqal miżjud fil-konċentrazzjoni magħżula normalment jitħejja billi tiżdied soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test direttament fin-naqal. Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test dissolta f'ilma dejonizzat titħallat man-naqal ifformulat mitħna ta' rrumblar, ħallat tal-għalf jew taħlit bl-idejn. Jekk ftit li xejn tinħall fl-ilma, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi dissolta f'volum żgħir kemm jista' jkun ta' solvent organiku xieraq (eż. essan, aċetun jew kloroformi). Imbagħad is-soluzzjoni titħallat ma' 10 g ramel kwarzuż fin għal kull reċipjent tat-test. Is-solvent jitħalla jevapora u għandu jitneħħa kompletament mir-ramel; imbagħad ir-ramel jitħallat mal-ammont xieraq tan-naqal. Jistgħu jintużaw biss aġenti li jivvolatilizzaw malajr sabiex iħollu, jifirxu jew jemulsifikaw is-sustanza kimika tat-test. Ta' min ifakkar li r-ramel ipprovdut mis-sustanza kimika tat-test u t-taħlita ta' ramel għandu jittieħed f'kunsiderazzjoni meta jitħejja

▼M6

n-naqal (jiġifieri, b'ħekk, in-naqal għandu jitħejja b'inqas ramel). Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test miżjuda man-naqal hija mifruxa u mqassma sew fin-naqal. Jekk hemm bżonn, is-subkampjuni jistgħu jiġu analizzati sabiex jiġi stabbilit il-grad ta' omoġenità.

DISINN TAT-TEST

17. Id-disinn tat-test huwa marbut mal-għażla tan-numru u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' reċipjenti f'kull konċentrazzjoni, in-numru ta' larva għal kull reċipjent, in-numru ta' dixxijiet kristallizzanti u l-gaġeġ tat-tgħammir. Id-disinji għall-EC_x, NOEC u test tal-limitu huma deskritti hawn taħt.

Disinn għall-analiżi b'rigressjoni

18. Il-konċentrazzjoni effettiva (EC_x,) u l-medda tal-konċentrazzjoni li huwa ta' interess l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuqha, għandha tkun ikkalibrata mit-test, b'tali mod li l-punt ta' tmiem ma jiġix estrapolat barra l-konfini tad-dejta ġġenerata. Għandha tiġi evitata estrapolazzjoni ferm inqas mill-inqas jew ogħla mill-ogħla konċentrazzjoni. Test preliminari tas-sejbien tal-medda skont il-Metodi ta' Ttestjar C.27 jew C.28 jista' jkun siewi meta tiġi biex tingħażel medda xierqa tal-konċentrazzjonijiet tat-test.

19. Għal approċċ tal-EC_x, huma meħtieġa tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet u tmien irreplikati għal kull konċentrazzjoni. Għal kull konċentrazzjoni għandhom jintużaw żewġ gaġeġ tat-tgħammir (A u B). It-tmien irreplikati jinqasmu f'żewġ gruppi ta' erba' rreplikati biex iservu kull gaġġa tat-tgħammir. Dan it-tagħqid tal-irreplikati huwa meħtieġ minħabba n-numru ta' insetti meħtieġa fil-gaġġa għall-valutazzjonijiet tar-riproduzzjoni tal-ħsejjes. Madankollu, it-tieni ġenerazzjoni għandha tmien irreplikati wkoll, li l-ewwel bdew fil-popolazzjonijiet esposti fil-gaġeġ tat-tgħammir. Il-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet li fihom il-kurva ta' doża — rispons ikollha inklinazzjoni grafika baxxa). In-numru ta' rreplikati f'kull trattament jista' jitnaqqas sa sitta (tlieta f'kull gaġġa tat-tgħammir) jekk jiżdied in-numru tal-konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti. Iżżieda tan-numru ta' rreplikati jew it-tnaqqis tad-daqs tal-intervalli tal-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom tendenza li jwasslu għal intervalli ta' kunfidenza iqsar madwar l-EC_X.

Disinn għall-istima ta' NOEC

20. Għal approċċ tal-NOEC, għandhom jintużaw ħames konċentrazzjonijiet tat-test b'tal-inqas tmien irreplikati (4 għal kull gaġġa tat-tgħammir, A u B) u l-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn. In-numru ta' rreplikati għandu jkun biżżejjed sabiex tiġi żgurata saħħa statistika adegwata sabiex tinstab differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikanza ta' 5 % (α = 0,05). Għar-rata tal-iżvilupp, il-fekondità u l-fertilità, normalment xieraq li ssir analiżi tal-varjana (ANOVA), segwita minn test ta' Tunnett jew ta' Williams (22-25). Għall-proporzjon tal-feġġa u l-proporzjon tas-sessi, it-test ta' Cochran-Armitage, it-test eżatt ta' Fisher (bil-korrezzjoni Bonferroni), jew it-test Mantel-Haentzal jistgħu jkunu xierqa.

Test tal-limitu

21. Jista' jsir test tal-limitu (konċentrazzjoni waħda tat-test u kontroll(i)) jekk ma jiġu osservati ebda effetti fit-test preliminari fakultattiv ta' sejbien tal-medda sa konċentrazzjoni massima. L-iskop tat-test tal-limitu huwa li jindika li nstab xi effett tossiku tas-sustanza kimika f'livelli ogħla mill-konċentrazzjoni limitu ttestjata. Huwa ssuġġerit li għall-ilma jintużaw 100 mg/l u għan-naqal 1 000 mg/kg (piż xott). Normalment, ikun hemm bżonn

▼M6

ta' minimu ta' tmien irreplikati kemm għat-trattament kif ukoll għall-kontroll. Għandha tintwera saħħa statistika adegwata biex tinstab differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikanza ta' 5 % (α = 0,05). B'risponsi metriċi (eż. rata tal-iżvilupp), it-test-t huwa metodu statistiku xieraq jekk id-dejta tissodisfa r-rekwiżiti ta' dan it-test (normalità, varjanzi omoġeni). Jista' jintuża test-t tal-varjanza mingħajr ekwivoku jew test mhux parametriku, bħat-test ta' Wilcoxon-Mann-Whitney, jekk ma jkunux issodisfati dawn ir-rekwiżiti. Bil-proporzjon tal-feġġa, xieraq li jintuża t-test eżatt ta' Fisher.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tal-espożizzjoni

Tħejjija tas-sistema tal-ilma-naqal (ilma miżjud)

22. a. Naqal ifformulat (ara l-paragrafi 13-14 u l-Appendiċi 3) jiddaħħal f'kull reċipjent tat-test u dixx kristallizzanti sabiex jiġi fformat saff ta' tal-inqas 1,5 cm (għad-dixx kristallizzanti jista' jkun kemxejn inqas) iżda mhux iktar minn 3 cm. L-ilma (ara l-paragrafu 15) jiżdied sabiex il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal u l-fond tal-ilma ma jaqbiżx il-1:4. Wara li jitħejjew ir-reċipjenti tat-test, is-sistema tan-naqal-ilma għandha titħalla tieħu arja ħafifa għal madwar sebat ijiem qabel ma tiddaħħal l-ewwel larva instar tal-ewwel jew it-tieni ġenerazzjoni (ara l-paragrafu 14 u l-Appendiċi 3). Is-sistema tan-naqal-ilma tad-dixxijiet kristallizzanti ma tingħatax arja matul it-test, peress li dawn ma għandhomx bżonn isostnu s-sopravivenza tal-larva (qabel ma jfaqqsu ċ-ċwiemi bajd diġà miġburin). Sabiex tiġi evitata separazzjoni tal-ingredjenti tan-naqal u s-sospensjoni mill-ġdid tal-materjal fin matul iż-żieda tal-ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, in-naqal jista' jitgħatta b'diska tal-plastik filwaqt li jitferra' l-ilma fiha. Id-diska titneħħa eżatt wara. Jistgħu jintużaw apparati xierqa oħrajn.

Tħejjija tas-sistema ta' ilma-naqal (naqal miżjud)

22. b. Kull naqal miżjud imħejji skont il-paragrafu 16b jitqiegħed fir-reċipjent u dixx kristallizzanti u jitferra' l-ilma tal-madwar sabiex jiġi prodott proporzjon tal-volum tan-naqal-ilma ta' 1:4. Il-fond tas-saff tan-naqal għandu jvarja bejn 1,5 sa 3 cm (jista' jkun kemxejn inqas għad-dixx kristallizzanti). Sabiex tiġi evitata separazzjoni tal-ingredjenti tan-naqal u s-sospensjoni mill-ġdid tal-materjal fin meta jitferra' l-ilma fil-kolonna tal-ilma, in-naqal jista' jitgħatta b'diska tal-plastik meta jkun qed jitferra' l-ilma, u d-diska titneħħa għal kollox wara. Jistgħu jintużaw apparati xierqa oħrajn. Ladarba jitħejja n-naqal miżjud bl-ilma tal-madwar, idealment tkun tista' ssir partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test min-naqal għall-fażi milwiema (4) (5) (7) (18). Idealment dan għandu jsir fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u tal-arja użati fit-test. Iż-żmien għall-ekwilibrazzjoni xierqa huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanza kimika, u jista' jvarja bejn sigħat sa jiem u f'każijiet rari sa ħames ġimgħat. Peress li sa dan iż-żmien ħafna sustanzi kimiċi jibdew jiddegradaw, m'hemmx bżonn li wieħed jistenna ekwilibriju, iżda huwa rrakkomandat perjodu ta' 48 siegħa għall-ekwilibrazzjoni. Madankollu, meta n-nofs ħajja tad-degradazzjoni tas-sustanza kimika fin-naqal ikun magħruf bħala wieħed twil (ara l-paragrafu 8), il-ħin għall-ekwilibrazzjoni jista' jiġi estiż. Fi tmiem dan il-perjodu mtawwal għall-ekwilibrazzjoni, għandha titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal, tal-inqas fl-ogħla konċentrazzjoni u waħda inqas (ara l-paragrafu 38). Dawn id-determinazzjonijiet analitiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test jippermettu sabiex jiġi kkalkolat il-bilanċ tal-massa u jinħarġu r-riżultati fuq il-bażi tal-konċentrazzjonijiet imkejlin.

23. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitgħattew (eż. bi platti tal-ħġieġ). Jekk hemm bżonn, matul l-istudju jista' jiżdied l-ilma biex ipatti għall-evaporazzjoni bil-għan li jerġa' jintlaħaq il-volum oriġinali. Dan għandu jsir bl-użu ta' ilma distillat jew dejonizzat sabiex tiġi evitata kwalunkwe akkumulazzjoni ta' melħ. Id-dixxijiet kristallizzanti fil-gaġeġ tat-tgħammir

▼M6

mhumiex mgħottjin u jistgħu, iżda mhux bilfors, jiġu aġġustati sabiex ipattu għat-telf tal-ilma matul il-perjodu tat-test, peress li ċ-ċwiemi bajd jidħlu f'kuntatt mal-ilma għal madwar jum wieħed biss u d-dixxijiet jintużaw biss għal perjodu qasir tat-test.

Tidħil tal-organiżmi tat-test

24. Erba' sa ħamest ijiem qabel ma tiddaħħal l-ewwel larva għall-ewwel ġenerazzjoni, il-mases tal-bajd għandhom jittieħdu mill-koltura u jitqiegħdu f'reċipjenti żgħar f'midjum tal-koltura. Jista' jintuża midjum antik mill-koltura tal-istokk jew inkella midjum imħejji ġdid. Xorta waħda dejjem għandu jiżdied ammont żgħir ta' ikel, eż. ftit taqtiriet ta' filtrat minn sospensjoni mitħuna sew ta' għalf tal-ħut imsaffaf, mal-midjum tal-koltura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss mases ta' bajd frisk. Is-soltu, il-larva tibda taqqas ftit tal-jiem wara li l-adulti jbidu (jumejn sa 3 ijiem għal *C. riparius* f'20 °C u bejn jum u erbgħa għal *C. dilutus* at 23 °C u *C. yoshimatsui* f'25 °C) u t-tkabbir tal-larva jseħħ f'erba' instars, b'kull wieħed b'durata ta' bejn 4 u 8 ijiem. Fit-test għandu jintuża l-ewwel larva instar (massimu ta' 48 siegħa wara t-tifqis). L-istadju instar tal-larva jista' jiġi vverifikat billi tintuża l-wisgħa tal-kapsula tar-ras (7).

25. L-ewwel għoxrin larva instar għall-ewwel ġenerazzjoni jiġu allokati għal għarrieda għal kull reċipjent tat-test li fih is-sistema ta' naqal-ilma, bl-użu ta' pipetta bil-ponta. L-ilma ma jibqax jingħata l-arja meta tkun qed tiddaħħal il-larva fir-reċipjenti tat-test u dan għandu jibqa' jseħħ għal 24 siegħa wara li tiddaħħal il-larva (ara l-paragrafu 32). Skont id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), in-numru ta' larva użata għal kull konċentrazzjoni huwa tal-inqas 120 (6 irreplikati għal kull konċentrazzjoni) għall-approċċ tal-EC_X u 160 għall-approċċ tal-NOEC (8 irreplikati għal kull konċentrazzjoni). Fid-disinn tan-naqal miżjud, l-espożizzjoni tibda billi tiddaħħal il-larva.

Ilma tal-madwar miżjud

26. Erbgħa u għoxrin siegħa wara li tiddaħħal l-ewwel larva instar għall-ewwel ġenerazzjoni, is-sustanza kimika tat-test tiżdied fil-kolonna tal-ilma tal-madwar, u terġa' tingħata ftit arja (għal emendi possibbli fid-disinn tat-test, ara l-paragrafu 7). Jiġu applikati volumi żgħar tas-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma bl-użu ta' pipetta. Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jitħawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Fid-disinn tal-ilma miżjud, l-espożizzjoni tibda biż-żieda fl-ilma (jiġifieri jum wara li tiddaħħal il-larva).

Ġbir tal-adulti li feġġew

27. L-insetti li feġġew tal-ewwel ġenerazzjoni jinġabru tal-inqas darba, iżda idealment darbtejn kuljum (ara l-punt 36) mir-reċipjenti tat-test bl-użu ta' aspiratur, eżawrient jew apparat simili (ara l-Appendiċi 5). Għandha tingħata attenzjoni speċjali sabiex l-adulti ma jġarrbux ġrieħi. L-insetti miġburin mill-erba' reċipjenti tat-test fi ħdan trattament wieħed jinħelsu f'gaġġa tat-tgħammir li kienu ġew assenjati fiha. Fil-jum tal-ewwel feġġa (ta' raġel), id-dixxijiet kristalizzanti jiżdiedu permezz ta' pipetta b'volum żgħir tas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma (id-disinn tal-ilma miżjud). Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jitħawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Nominalment, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fid-dixx kristallizzanti hija l-istess bħal fir-reċipjenti tat-trattament li huma assenjati għal dik il-gaġġa

▼**M6**

tat-tgħammir speċifika. Għad-disinn tan-naqal miżjud, id-dixxijiet kristallizzanti huma mħejjijin f'madwar il-jum 11 wara l-bidu tal-espożizzjoni (jiġifieri t-tidħil tal-larva tal-ewwel ġenerazzjoni) sabiex ikunu jistgħ jekwilibraw għal madwar 48 siegħa qabel jiġu prodotti l-ewwel ċwiemi bajd.

28. Iċ-ċwiemi bajd jinġabru mid-dixx kristallizzanti fil-gaġġa tat-tgħammir bl-użu ta' pinzetti jew pipetta bil-ponta. Kull ċima bajd titqiegħed f'reċipjent li fih midjum tal-koltura mid-dixx kristallizzanti li nġabret minnu (eż. toqba ta' mikroplatt bi 12-il toqba flimkien ma' tal-inqas 2,5 ml midjum). Ir-reċipjenti biċ-ċwiemi bajd huma mgħottjin b'għatu sabiex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. Iċ-ċwiemi tal-bajd jinżammu taħt osservazzjoni għal tal-inqas sitt ijiem wara li jkunu ġew prodotti sabiex ikunu jistgħu jiġu kklassifikati bħala fertili jew infertili.

Għall-bidu tat-tieni ġenerazzjoni, tal-inqas tlieta iżda idealment sitt ċwiemi bajd fertili jingħażlu minn kull gaġġa tat-tgħammir u flimkien ma' xi ikel jitħejjew ifaqqsu. Dawn iċ-ċwiemi bajd ġew prodotti fl-eqqel żmien ta' ovipożizzjoni, li normalment iseħħ madwar il-jum 19 tat-test fil-kontrolli. Idealment, it-tieni ġenerazzjoni tat-trattamenti kollha tinbeda dakinhar stess, iżda minħabba l-effetti relatati mas-sustanza kimika fuq l-iżvilupp tal-larva, dan mhux dejjem ikun possibbli. F'każ bħal dan, il-konċentrazzjonijiet ogħla jistgħu jinbdew iktar tard meta mqabblin mat-trattamenti inqas u l-kontroll (bis-solvent).

29. a. Fid-disinn tal-ilma miżjud, is-sistema tan-naqal-ilma għat-tieni ġenerazzjoni titħejja billi tiżdied is-sustanza kimika tat-test fil-kolonna tal-ilma tal-madwar madwar siegħa qabel tiddaħħal l-ewwel larva instar fir-reċipjenti tat-test. Jiġu applikati volumi żgħar tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma bl-użu ta' pipetta. Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jitħawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Wara ż-żieda, tingħata ftit arja.

29. b. Fid-disinn tan-naqal miżjud, ir-reċipjenti ta' espożizzjoni li fihom is-sistema tan-naqal-ilma għat-tieni ġenerazzjoni jitħejjew bl-istess mod bħall-ewwel ġenerazzjoni.

30. L-ewwel għoxrin larva instar (mhux iktar minn 48 siegħa wara t-tifqis) tat-tieni ġenerazzjoni jiġu allokati għall-għarrieda għal kull reċipjent tat-test li fih is-sistema ta' naqal-ilma miżjuda, bl-użu ta' pipetta bil-ponta. L-ilma ma għandux jibqa' jingħata arja filwaqt li tiddaħħal l-ewwel larva instar fir-reċipjenti tat-test u dan għandu jibqa' jseħħ għal 24 siegħa oħra wara li tiddaħħal il-larva. Skont id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), in-numru ta' larva użata għal kull konċentrazzjoni huwa tal-inqas 120 (6 irreplikati għal kull konċentrazzjoni) għall-approċċ tal-EC_X u 160 għall-approċċ tal-NOEC (8 irreplikati għal kull konċentrazzjoni).

Ikel

31. Hemm bżonn li l-larva jingħataw għalt fir-reċipjenti tat-test, idealment kuljum jew tal-inqas tliet darbiet fil-ġimgħa. 0,25 — 0,5 mg (0,35 — 0,5 mg għal C. yoshimatsui) għalf għall-ħut (sospensjoni fl-ilma jew ikel mitħun fin, eż. Tetra-Min jew Tetra-Phyll; ara d-dettalji fl-Appendiċi 2) għal kull larva kull jum huwa ammont adegwat ta' ikel għal larva żgħar matul l-ewwel għaxart ijiem tal-iżvilupp tagħhom. Larva ikbar tista' tkun teħtieġ ftit iktar ikel: 0,5 — 1,0 mg għal kull larva kull jum għandu jkun biżżejjed għall-bqija tat-test. Il-porzjon tal-ikel għandha titnaqqas fit-trattamenti kollha u l-kontroll jekk jiġi osservat tkabbir fungali jew jekk tiġi osservata mortalità fil-kontrolli. Jekk l-iżvilupp fungali ma jkunx jista' jitwaqqaf, it-test għandu jiġi rripetut.

Ir-relevanza tossikoloġika tal-espożizzjoni permezz ta' inġestjoni ġeneralment tkun ikbar f'sustanzi kimiċi b'affinità għolja għal karbonju organiku

▼M6

jew sustanzi kimiċi b'rabta kovalenti man-naqal. B'ħekk, meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi b'dawn il-karatteristiċi, l-ammont ta' ikel meħtieġ sabiex jiġu żgurati sopravivenza u tkabbir naturali tal-larva jista' jiżdied man-naqal ifformulat qabel il-perjodu ta' stabilizzazzjoni, skont id-domanda regolatorja. Sabiex jiġi evitat milli titgħarraq il-kwalità tal-ilma, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok għalf għall-ħut, eż. żieda ta' 0,5 % (piż xott) weraq mitħunin fini ta' ħurrieq (*Urtica dioica*), ċawsli (*Morus alba*), xnien abjad (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*) jew materjal ieħor tal-pjanti (*Cerophyl* jew *α*-ċelluloża). L-għoti tal-proporzjon sħiħ ta' sors tal-ikel organiku fin-naqal qabel iż-żieda mhuwiex trivjali fir-rigward tal-kwalità tal-ilma u l-prestazzjoni bijoloġika (21), u lanqas metodu standardizzat, iżda studji riċenti jagħtu indikazzjonijiet li dan il-metodu jaħdem (19) (26). Normalment, l-insetti adulti fil-gaġġa tat-tgħammir ma jeħtieġu ebda tmigħ, iżda l-fekondità u l-fertilità jissaħħu meta tajjara mxarrba f'soluzzjoni tas-sukrożju saturat tiġi offruta bħala sors tal-ikel għal adulti li feġġew (34).

Kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni

32. L-għoti ta' ftit arja lill-ilma tal-madwar fir-reċipjenti tat-test isir 24 siegħa wara li tiddaħħal l-ewwel larva instar taż-żewġ ġenerazzjonijiet u jkompli jseħħ matul it-test sħiħ (għandha tingħata attenzjoni li l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt ma taqax taħt is-60 % tal-ASV). Tingħata l-arja permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħġieġ li l-iżbokk tagħha huwa fiss 2-3 cm 'il fuq mis-saff tan-naqal u tagħti ftit bżieżaq/sek. Meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi volatili, għandha tingħata kunsiderazzjoni sabiex ma tingħatax arja lis-sistema ta' naqal-ilma, filwaqt li fl-istess ħin għandu jiġi ssodisfat il-kriterju ta' validità tal-ASV minimu ta' 60 % (paragrafu 10). Tingħata gwida ulterjuri f'(16).

33. It-test b'*C. riparius* isir f'temperatura kostanti ta' 20°C (± 2 °C). Għal *C. dilutus* u *C. yoshimatsui*, it-temperaturi rrakkomandati huma 23 °C u 25 °C (± 2 °C), rispettivament. Jintuża fotoperjodu ta' 16-il siegħa u l-intensità tad-dawl għandha tkun ta' 500 sa 1 000 lux. Għall-gaġeġ tat-tgħammir tista' tiġi inkluża fażi ta' siegħa addizzjonali taż-żerniq u raxx id-dlam.

Durata tal-espożizzjoni

34. Disinn tal-ilma miżjud: Il-perjodu ta' espożizzjoni tal-ewwel ġenerazzjoni jibda meta l-oġġett tat-test jiżdied fl-ilma fir-reċipjenti tat-test (li jsir jum wara t-tidħil tal-larva — għal emendi possibbli tad-disinn tal-espożizzjoni, ara l-paragrafu 7). L-espożizzjoni tat-tieni ġenerazzjoni tal-larva tibda minnufih, peress li tiddaħħal f'sistema tan-naqal-ilma li diġà ġiet miżjuda. Id-durata massima tal-espożizzjoni għall-ewwel ġenerazzjoni hija ta' 27 jum u għat-tieni ġenerazzjoni 28 jum (il-larva tal-ewwel ġenerazzjoni tqatta' jum fir-reċipjenti bla espożizzjoni) għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*. Fid-dawl tas-sovrappożizzjoi, id-durata sħiħa tat-test hija ta' madwar 44 jum. Għal *C. dilutus*, id-durati massimi tal-espożizzjoni huma ta' 64 u 65 jum, għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni, rispettivament. Id-durata totali hija ta' madwar 100 jum.

Disinn tan-naqal miżjud: l-espożizzjoni tibda billi tiddaħħal il-larva u hija ta' massimu ta' 28 jum għaż-żewġ ġenerazzjonijiet għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui* u massimu ta' 65 jum għaż-żewġ ġenerazzjonijiet għal *C. dilutus*.

Osservazzjonijiet

Emerġenza

35. Iż-żmien tal-iżvilupp u n-numru totali tal-insetti rġiel u nisa ħajjin u li feġġew kompletament jiġu stabbiliti għaż-żewġ ġenerazzjonijiet. L-irġiel faċli jiġu identifikati mill-antenni piluži u l-ġisem irqiq tagħhom.

▼M6

36. Ir-reċipjenti tat-test taż-żewġ ġenerazzjonijiet għandhom jiġu osservati tal-inqas tliet darbet fil-ġimgħa biex issir valutazzjoni viżwali ta' kwalunkwe mġiba anormali tal-larva (eż. jitilqu min-naqal, għawm mhux bħas-soltu), meta mqabbla mal-kontroll. Matul il-perjodu tal-feġġa, li jibda madwar 12-il jum wara t-tidħil tal-larva għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui* (wara 20 jum għal *C. dilutus*), l-insetti li jfeġġu jingħaddu u jitqassmu skont is-sess tal-inqas darba, iżda idealment darbtejn kuljum (kmieni filgħodu u tard waranofshinar). Wara li jiġu identifikati, l-insetti tal-ewwel ġenerazzjoni jitneħħew bil-galbu mir-reċipjenti u jiġu ttrasferiti f'gaġġa tat-tgħammir. Insetti tat-tieni ġenerazzjoni jitneħħew u jinqatlu wara li jiġu identifikati. Kwalunkwe ċima bajd iddepożitata fir-reċipjenti tat-test tal-ewwel ġenerazzjoni għandha tinġabar għaliha u tiġi ttrasferita ma' tal-inqas 2,5 ml ilma nattiv f'mikroplatti bi 12-il toqba (jew reċipjenti xierqa oħrajn) li jitgħattew b'għatu sabiex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. In-numru ta' larva mejta u pupi viżibbli li naqsu milli jfeġġu għandu jiġi rreġistrat ukoll. Eżempji ta' gaġġa tat-tgħammir, reċipjent tat-test u eżawrient huma pprovduti fl-Appendiċi 5.

Riproduzzjoni

37. L-effetti fuq ir-riproduzzjoni huma vvalutati permezz tan-numru ta' ċwiemi bajd prodotti mill-ewwel ġenerazzjoni ta' insetti u l-fertilità ta' dawn iċ-ċwiemi bajd. Iċ-ċwiemi bajd jinġabru darba kuljum mid-dixx kristallizzanti li jitqiegħed f'kull kontenitur tat-tgħammir. Iċ-ċwiemi bajd għandhom jinġabru u jiġu ttrasferiti ma' tal-inqas 2,5 ml ilma nattiv f'mikroplatt bi 12-il toqba (ċima bajd waħda f'kull toqba) jew reċipjenti xierqa oħrajn, li jitgħattew b'għatu biex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. Il-karatteristiċi li ġejjin huma ddokumentati għal kull ċima bajd: jum il-produzzjoni, daqs (normali, jiġifieri 1,0 ± 0,3 cm jew żgħar; tipikament ≤ 0,5 cm), u struttura (normali = forma ta' banana bi spaga bajd fi spiral jew anormali, eż. spaga bajd mhux fi spiral) u l-fertilità (fertili jew infertili). Matul is-sitt ijiem wara li tiġi prodotta, tiġi vvalutata l-fertilità ta' ċima bajd. Ċima bajd titqies fertili meta jfaqqsu tal-inqas terz mill-bajd. In-numru totali ta' nisa mdaħħlin fil-gaġġa tat-tgħammir jintuża sabiex jiġi kkalkolat in-numru ta' ċwiemi bajd għal kull mara u n-numru ta' ċwiemi bajd fertili għal ull mara. Jekk ikun hemm bżonn, in-numru ta' bajd f'ċima bajd jista' jiġi stmat mingħajr qirda bl-użu tal-metodu ta' għadd taċ-ċrieki (spjegat fi 32 u 33).

Kejliet analitiċiti

Konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

38. Bħala minimu, il-kampjuni tal-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal għandhom jiġu analizzati fil-bidu tal-espożizzjoni (fil-każ ta' ilma miżjud, idealment siegħa wara l-applikazzjoni) u fi tmiem it-test, fl-ogħla konċentrazzjoni u waħda inqas. Dan japplika għal reċipjenti miż-żewġ ġenerazzjonijiet. Mid-dixxijiet kristallizzanti fil-gaġġa tat-tgħammir jiġi analizzat l-ilma tal-madwar biss, peress li dan huwa ma' xiex jidħlu f'kuntatt iċ-ċwiemi bajd (għad-disinn tan-naqal miżjud, tista' tiġi kkunsidrata konferma analitika tal-konċentrazzjoni tan-naqal). Jistgħu jsiru kejliet oħrajn tan-naqal, l-ilma tal-pori jew l-ilma tal-madwar matul it-test, jekk dawn jitqiesu neċessarji. Dawn id-determinazzjonijiet tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jipprovdu informazzjoni dwar l-imġiba/il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-sistema tal-ilma-naqal. Il-kampjunar tan-naqal u l-ilma tal-pori fil-bidu u matul it-test (ara l-paragrafu 39) jeħtieġ reċipjenti addizzjonali tat-test sabiex isiru determinazzjonijiet analitiċi. Il-kejliet fin-naqal fid-disinn tal-ilma miżjud jaf ma jkunux

▼M6

meħtieġa jekk il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn l-ilma u n-naqal tkun iddeterminata biċ-ċar fi studju tal-ilma/naqal f'kundizzjonijiet paragunabbli (eż. proporzjon tan-naqal għall-ilma, it-tip ta' applikazzjoni, il-kontenut ta' karbonju organiku tan-naqal), jew jekk jintwera li l-konċentrazzjonijiet imkejlin fl-ilma tal-madwar jibqgħu fi ħdan it-80 sa 120 % tal-konċentrazzjonijiet inizjali nominali jew imkejlin.

39. Meta jsiru kejliet intermedji (eż. fil-jum 7 u/jew 14) u jekk l-analiżi teħtieġ kampjuni kbar li ma jistgħux jittieħdu mir-reċipjenti tat-test bla ma tiġi influwenzata s-sistema tat-test, għandhom isiru determinazzjonijiet analitiċi fuq kampjuni minn reċipjenti addizzjonali tat-test ittrattati bl-istess mod (inkluża l-preżenza tal-organiżmi tat-test) iżda mhux użati għal osservazzjonijiet bijoloġiċi.

40. Ċentrifugazzjoni, eż., b'10 000 g f'4 °C għal 30 min hija l-proċedura rrakkomandata biex jiġi iżolat ilma interstizjali (= tal-pori). Madankollu, jekk jintwera li s-sustanza kimika tat-test ma tassorbix filtri, tista' tkun aċċettata filtrazzjoni wkoll. F'ċerti każijiet, jaf ma jkunx possibbli li jiġu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori peress li l-volum tal-kampjun jista' jkun żgħir wisq.

Parametri fiżikokimiċi

41. Il-pH, l-ossiġenu dissolt fl-ilma tat-test u t-temperatura tal-ilma fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti għandhom jitkelju kif xieraq (ara l-paragrafu 10). L-ebusija u l-ammonijaka għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent tat-test wieħed u f'dixx kristallizzanti fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fi tmiem it-test.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

42. L-iskop ta' dan it-test taċ-ċiklu tal-ħajja huwa li jiġi stabbilit l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-riproduzzjoni u, għal żewġ ġenerazzjonijiet, ir-rata tal-iżvilupp u n-numru totali tal-insetti rġiel u nisa ħajjin u li feġġew kompletament. Għad-dejta dwar il-proporzjon tal-feġġa, l-irġiel u n-nisa għandhom jiġu raggruppati. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn is-sensitivitajiet fir-rata tal-iżvilupp tas-sessi separati, ir-riżultati tal-irġiel u n-nisa jistgħu jitgħaqqdu flimkien għal analiżi statistika.

43. Il-konċentrazzjonijiet effettivi mogħtijin bħala konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-madwar (għal ilma miżjud) jew fin-naqal (għal naqal miżjud), normalment jiġu kkalkolati fuq il-bażi tal-konċentrazzjonijiet imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni (ara l-paragrafu 38). Għalhekk, għal ilma miżjud, tinstab il-medja għal kull trattament tal-konċentrazzjonijiet tipikament imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni fl-ilma tal-madwar tar-reċipjenti għaż-żewġ ġenerazzjonijiet u dawk tad-dixxijiet kristallizzanti. Għal naqal miżjud, tinstab il-medja għal kull trattament tal-konċentrazzjonijiet tipikament imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni fir-reċipjenti għaż-żewġ ġenerazzjonijiet (u dawk tad-dixxijiet kristallizzanti, iżda mhux bilfors).

44. Biex tiġi kkalkolata stima ta' punt, jiġifieri EC_x, jistgħu jintużaw l-istatistiki għal kull reċipjent u kull gaġġa tat-tgħammir bħala rreplikati veri. Fil-kalkolu ta' intervall tal-kunfidenza għal kwalunkwe EC_x, għandu jingħata kont lill-varjabbiltà bejn ir-reċipjenti, jew inkella għandu jintwera li din il-varjabbiltà tant hija żgħira li tista' ma tagħtix kasha. Meta l-mudell jiġi adattat skont l-Inqas Kaxex, għandha tiġi applikata trasformazzjoni għall-istatistiki għal kull reċipjent sabiex titjieb l-omoġenità tal-varjanza. Madankollu, il-valuri tal-EC_x għandhom jiġu kkalkolati wara li r-rispons jiġi ttrasformat lura lejn il-valur oriġinali (31).

▼M6

45. Meta l-analiżi statistika jkollha l-għan li tiddetermina l-NOEC permezz ta' ttestjar tal-ipoteżi, irid jinghata kont lill-varjabblità bejn ir-reċipjenti, u dan huwa ggarantit bl-użu tal-metodi ANOVA (eż. il-proċeduri tat-test ta' Williams u Dunnett). It-test ta' Williams ikun xiraq meta fit-teorija jkun mistenni rispons-doża monotoniku u t-test ta' Dunnett ikun xieraq meta ma tkunx valida l-ipoteżi tal-monotoniċità. Inkella, jistgħu jkunu xierqa testijiet iktar robusti (27) f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm ksur tas-suppożizzjonijiet normali tal-ANOVA (31).

Proporzjon tal-feġġa

46. Il-proporzjonijiet tal-feġġa huma dejta kwantali, u jistgħu jiġu analizzati bit-test rigressiv Cochran-Armitage meta jkun mistenni doża-rispons monotoniku u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-aspettattiva. Jekk le, jista' jintuża test eżatt ta' Fisher jew Mantel-Haentzal b'valuri-p aġġustati ta' Bonferroni-Holm. Jekk hemm evidenza ta' varjabbiltà ikbar bejn l-irreplikati fi ħdan l-istess konċentrazzjoni milli tindika distribuzzjoni binomjali (spiss imsejħa bħala varjazzjoni "extrabinomjali", f'dak il-każ għandu jintuża test eżatt ta' Fisher jew Cochran-Armitage robust bħal kif propost f'(27).

Is-somma tal-insetti ħajjin (irġiel u nisa f'daqqa) li feġġew għal kull reċipjent, n_e, hija stabbilita u maqsuma bin-numru ta' larva mdaħħla, n_a:

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

fejn:

ER = proporzjon tal-feġġa

n_e = in-numru ta' insetti ħajjin li feġġew għal kull reċipjent

n_a = in-numru ta' larva mdaħħla għal kull reċipjent (normalment 20)

Meta n_e jkun ikbar minn n_a (jiġifieri meta jkun ikbar b'mod imprevist min-numru previst ta' larva mdaħħla) n_a għandu jkun ekwivalenti għal n_e.

47. *Approċċ ieħor li huwa l-iktar xieraq għal daqsijiet ta' kampjuni kbar, meta jkun hemm varjanza binomjali żejda, huwa li l-proporzjon tal-feġġa jiġi ttrattat bħala rispons kontinwu u jintużaw proċeduri konsistenti ma' din id-dejta dwar l-ER.* Daqs ta' kampjun kbir hawnhekk huwa ddefinit bħala n-numru ta' insetti li feġġew u n-numru li ma feġġewx li t-tnejn li huma jaqbżu l-ħamsa, fuq bażi għal kull irreplikat (għal kull reċipjent).

48. Sabiex jiġu applikati l-metodi ANOVA, l-ewwel il-valuri tal-*ER* iridu jiġu ttrasformati mit-trasformazzjoni tal-għerq kwadrat tal-arksin jew it-trasformazzjoni Tukey-Freeman sabiex tinkiseb distribuzzjoni approssimata normali u biex jiġu ekwalizzati l-varjanzi. Jista' jiġi applikat it-test ta' Cochran-Armitage, it-test eżatt ta' Fisher (Bonferroni), jew it-test ta' Mantel-Haentzal meta jintużaw il-frekwenzi assoluti. It-trasformazzjoni tal-għerq kwadrat tal-arksin hija applikata billi jittieħed is-sine invers ($\sin e^{-1}$) tal-għerq u kwadrat tal-*ER*.

49. Għal proporzjonijiet tal-feġġa, il-valuri EC_x huma kkalkolati bl-użu ta' analiżi tar-rigressjoni (eż. mudelli probit, logit jew Weibull (28)). Jekk l-analiżi tar-rigressjoni ma tirnexxiex (eż. meta jkun hemm inqas minn żewġ risponsi parzjali), jistgħu jintużaw metodi mhux parametriċi oħrajn bħall-medja f'ċaqliq jew interpolazzjoni sempliċi.

Rata tal-iżvilupp

50. Iż-żmien medju tal-iżvilupp jirrappreżenta l-medda medja ta' żmien bejn it-tidħil tal-larva (jum 0 tat-test) u l-feġġa tal-koorta sperimentali ta' insetti

▼**M6**

(għall-kalkolu taż-żmien propju tal-iżvilupp, għandha tiġi kkunsidrata l-età tal-larva fi żmien it-tidħil). Ir-rata tal-iżvilupp (unità: 1/jum) hija r-reċiproku taż-żmien tal-iżvilupp u tirrappreżenta dak il-porzjon tal-iżvilupp tal-larva li jseħħ kull jum. Ir-rata tal-iżvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar it-tossiċità tan-naqal u l-varjanza tagħha huwa inqas, u hija iktar omoġena u eqreb distribuzzjoni normali meta mqabbla maż-żmien tal-iżvilupp. B'ħekk, jistgħu jintużaw proċeduri tat-test parametriku iktar b'saħħithom bir-rata tal-iżvilupp għall-kuntrarju taż-żmien tal-iżvilupp. Għar-rata tal-iżvilupp bħala rispons kontinwu, EC_x-il-valuri jistgħu jiġu stmati b'analiżi tar-rigressjoni (eż. (29) (30)). NOEC għar-rata medja tal-iżvilupp jista' jiġi stabbilit permezz tal-metodi ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett. Peress li l-irġiel ifeġġu iktar malajr min-nisa, jiġifieri għandhom rata tal-iżvilupp ogħla, jagħmel sens li tiġi kkalkolata r-rata tal-iżvilupp għal kull sess b'mod separat minbarra dik għall-insetti totali.

51. Għall-ittestjar statistiku, huwa supponut li n-numru ta' insetti osservati fil-jum ta' spezzjoni x feġġ fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn il-jum x u l-jum x – l (l = tul tal-intervall ta' spezzjoni, normalment jum). Ir-rata medja tal-iżvilupp għal kull reċipjent $\bar{x}$ () huwa kkalkolat skont:

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

fejn:

$\bar{x}$: ir-rata medja tal-iżvilupp għal kull reċipjent

i: l-indiċi tal-intervall ta' spezzjoni

m: in-numru massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

f_i: in-numru ta' insetti li feġġew fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e: in-numru totali ta' insetti li feġġew fi tmiem l-esperiment ()

x_i: ir-rata tal-iżvilupp tal-insetti li feġġew fl-intervall i

$$x_i = 1/\mathrm{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

fejn:

jum_i: jum l-ispezzjoni (jiem mit-tidħil tal-larva)

l_i: tul tal-intervall ta' spezzjoni i (jiem, normalment jum)

Proporzjon tas-sessi

52. Il-proporzjonijiet tas-sessi huma dejta kwantali u għaldaqstant għandhom jiġu evalwati permezz ta' test eżatt ta' Fisher jew metodi xierqa oħrajn. Il-proporzjon naturali tas-sessi ta' *C. riparius* huwa wieħed, jiġifieri l-irġiel u n-nisa huma abbundanti ndaqs. Għaż-żewġ ġenerazzjonijiet, id-dejta dwar il-proporzjon tas-sessi għandu jiġi ttrattat bl-istess mod. Peress li n-numru massimu ta' insetti għal kull reċipjent (jiġifieri 20) huwa baxx wisq għal

▼M6

analiżi statistika sinifikanti, in-numru totali ta' insetti li feġġew kompletament u ħajjin għal kull sess jingħadd mir-reċipjenti kollha ta' trattament wieħed. Din id-dejta mhux ittrasformata hija ttestjata kontra l-kontroll (bis-solvent) jew dejta kollettiva dwar il-kontroll f'tabella tal-kontinġenza 2 × 2.

Riproduzzjoni

53. Ir-riproduzzjoni, bħall-fekondità, hija kkalkolata bħala n-numru ta' ċwiemi bajd għal kull mara. B'mod iktar speċifiku, in-numru totali ta' ċwiemi bajd prodotti f'gaġġa tat-tgħammir huwa maqsun bin-numru totali ta' nisa ħajjin u mhux korruti mdaħħlin f'dik il-gaġġa. NOEC għall-fekondità tista' tiġi stabbilita permezz tal-metodi tal-ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett.

54. Il-fertilità taċ-ċwiemi bajd tintuża biex tikkwantifika n-numru ta' ċwiemi bajd fertili għal kull mara. In-numru totali ta' ċwiemi bajd fertili prodotti f'gaġġa tat-tgħammir jinqasam bin-numru totali ta' nisa ħajjin u mhux korruti mdaħħlin f'dik il-gaġġa. NOEC għall-fertilità tista' tiġi stabbilita permezz tal-metodi tal-ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett.

Rapport tat-test

55. Ir-rapport tat-test għandu jipprovdi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— l-għamla fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (solubilità fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent ta' partizzjoni fil-ħamrija (jew fin-naqal jekk disponibbli), l-istabbiltà fl-ilma u n-naqal eċċ.);

— dejta dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika (l-isem komuni, isem is-sustanza kimika, il-formula strutturali, in-numru tas-CAS, eċċ.) inklużi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Speċijiet tat-test:

— l-organiżmi tat-test użati: l-ispeċijiet, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organiżmi u l-kundizzjonijiet tat-tgħammir;

— informazzjoni dwar kif tqandlu l-mases bajd u l-larva;

— informazzjoni dwar it-tqandil tal-adulti li feġġew tal-ewwel ġenerazzjoni bl-għajnuna ta' eżawrient eċċ (ara l-Appendiċi 5)

— l-età tal-organiżmi tat-test fil-ħin tat-tidħil fir-reċipjenti tat-test tal-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

— in-naqal użat, jiġifieri naqal naturali jew ifformulat (artifiċjali);

— naqal naturali: post u deskrizzjoni tas-sit mnejn ittieħed kampjun tan-naqal, inkluża, jekk possibbli, l-istorja tal-kontaminazzjoni; il-karatteristiċi tan-naqal: il-pH, il-kontenut ta' karbonju argoniku, il-proporzjon C/N u l-granulometrija (jekk xieraq).

— naqal ifformulat: tħejjija, ingredjenti u karatteristiċi (il-kontenut ta' karbonju organiku, il-pH, l-umdità, eċċ. imkejlin fil-bidu tat-test);

— tħejjija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu, il-pH, l-ebusija, eċċ. imkejlin fil-bidu tat-test);

▼**M6**

— il-fond tan-naqal u l-ilma tal-madwar għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;

— il-volum tal-ilma tal-madwar u tal-pori; il-piż tan-naqal imxarrab bl-ilma tal-pori u mingħajr għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;

— reċipjenti tat-test (il-materjal u d-daqs);

— dixxijiet kristallizzanti (il-materjal u d-daqs);

— il-gaġeġ tat-tgħammir (il-materjal u d-daqs)

— il-metodu tat-tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-konċentrazzjonijiet tat-test għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;

— l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti: konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' rreplikati u s-solventi, jekk meħtieġa;

— il-kundizzjonijiet tal-inkubazzjoni għar-reċipjenti tat-test: it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl, l-għoti ta' arja (bżieżaq fis-sekonda);

— il-kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni għall-gaġeġ ta' tgħammir u d-dixxijiet kristallizzanti: it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl;

— il-kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni għaċ-ċwiemi bajd fil-mikroplatti (jew reċipjenti oħrajn): it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl:

— informazzjoni ddettaljata dwar it-tmigħ inklużi t-tip ta' ikel, it-tħejjija, l-ammont u r-reġim tat-tmigħ.

Riżultati:

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejlin tat-test u r-riżultati tal-analiżijiet kollha sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;

— il-kwalità tal-ilma fi ħdan ir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti, jiġifieri l-pH, it-temperatura, l-ossiġenu dissolt, l-ebusija u l-ammonijaka;

— is-sostituzzjoni tal-ilma evaporat tat-test għar-reċipjenti tat-test, jekk tkun seħħet;

— in-numru ta' insetti rġiel u nisa li feġġew għal kull reċipjent u għal kull jum għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;

— il-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin għal kull trattament għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni

— in-numru ta' larva li naqset milli tfeġġ bħala insetti għal kull reċipjent għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;

— il-perċentwal/frazzjoni tal-feġġa għal kull irreplikat u konċentrazzjoni tat-test (insetti rġiel u nisa kollettivi) għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;

— ir-rata medja tal-iżvilupp tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin għal kull irreplikat u r-rata tat-trattament (insetti rġiel u nisa separati u anki kollettivi) għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;

— in-numru ta' ċwiemi bajd iddepożitati fid-dixxijiet kristallizzanti għal kull gaġġa tat-tgħammir u l-jum;

▼**M6**

— il-karatteristiċi ta' kull ċima bajd (daqs, forma u fertilità);

— il-fekondità — in-numru totali ta' ċwiemi bajd għal kull numru totali ta' nisa mdaħħlin fil-gaġġa tat-tgħammir;

— il-fertilità — in-numru totali ta' ċwiemi bajd għal kull numru totali ta' nisa mdaħħlin fil-gaġġa tat-tgħammir;

— stimi tal-punti ta' tmiem tossiċi eż. EC_x (u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati), l-NOEC u l-metodi statistiċi użati sabiex tiġi stabbilita;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

(1) Il-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness, It-test dwar it-tossiċità tal-kironomidi tan-naqal-ilma bl-użu ta' ilma miżjud.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11,06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, It-test dwar it-tossiċità tal-kironomidi tan-naqal-ilma bl-użu ta' ilma miżjud.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485-1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application,* OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1-9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼**M6**

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita

Naqal ifformulat jew naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku huwa taħlita ta' materjali użati biex jimitaw il-komponenti fiżiċi tan-naqal naturali.

Ilma tal-madwar huwa l-ilma li jitqiegħed fuq in-naqal fir-reċipjent tat-test.

Ilma interstizjali jew ilma tal-pori huwa l-ilma li jokkupa l-post bejn in-naqal u l-partikoli tal-ħamrija.

Ilma miżjud huwa l-ilma tat-test li miegħu tiżdied is-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza kimika jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M6

Appendiċi 2

Rakkomandazzjonijiet għall-koltura ta' *Chironomus riparius*

1. Larva *Chironomus* tista' titrabba f'dixxijiet kristallizzanti jew kontenituri kbar. Ramel kwarzuż fin jitferrex f'saff irqiq ta' madwar 5 sa 100 mm fond f'qiegħ il-kontenitur. Intwera li anki Kieselgur (eż. Merck, Art 8117) huwa substrat xieraq (saff irqaq sa ftit mm biss huwa biżżejjed). Imbagħad jitferra' ilma xieraq b'fond sa bosta cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jerġgħu jittellgħu kemm ikun hemm bżonn sabiex jitpatta għat-telf mill-evaporazzjoni, u tiġi evitata dessikazzjoni. L-ilma jista' jitbiddel jekk ikun hemm bżonn. Għandha tingħata arja ħafifa. Ir-reċipjenti li fihom titrabba l-larva għandhom jinżammu f'gaġġa xierqa li ser tevita milli jaħarbu l-adulti li jfeġġu. Il-gaġġa għandha tkun kbira biżżejjed biex ikunu jistgħu jinġemgħu l-adulti li jfeġġu, inkella ma jkunx jista' jinħareġ kalkolu (minimu huwa ta' madwar 30 × 30 × 30 cm).

2. Il-gaġeġ għandhom jinżammu f'temperatura tal-kamra jew f'temperatura ambjentali kostanti ta' 20 ± 2 °C b'fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl (intensità ta' madwar 1 000 lux), 8 sigħat dlam. Ġie rrapportat li umdità fl-arja ta' inqas minn 60 % RH tista' timpedixxi r-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuża kwalunkwe ilma naturali jew sintetiku xieraq. Spiss jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit deklorinat u midjums artifiċjali (eż. il-midjum Elendt “M4” or “M7”). L-ilma għandu jingħata l-arja qabel jintuża. Jekk ikun hemm bżonn, l-ilma tal-koltura jista' jiġġedded billi l-ilma użat jitferra jew jitbattal mir-reċipjenti tal-koltura bil-galbu mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larva.

Tmigħ tal-larva

4. Larva *Chironomus* għandha tingħata ikel imsaffaf tal-ħut (Tetra Min®, Tetra Phyll® jew ditta simili oħra ta' ikel tal-ħut proprjetarju), b'madwar 250 mg għal kull reċipjent kuljum. Dan jista' jingħata bħala trab miħun xott jew bħala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ikel imsaffaf jiżdied ma' 20 ml ilma ta' dilwizzjoni u jitħallat sabiex tingħata taħlita omoġena. Din il-preparazzjoni tista' tintema' b'rata ta' madwar 5 ml għal kull reċipjent kuljum. (heżżiżha qabel tużaha.) Larva ikbar tista' tingħata iktar.

5. It-tmigħ jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum tal-koltura jsir “imċajpar”, it-tmigħ għandu jitnaqqas. Iż-żidiet tal-ikel għandhom jiġu ssorveljati bil-galbu. Ikel fi kwantitajiet żgħar wisq ser jikkaġuna emigrazzjoni tal-larva lejn il-kolonna tal-ilma, u ikel żejjed ser jikkaġuna attività mikrobjali ikbar u konċentrazzjonijiet inqas tal-ossiġenu. Iż-żewġ kundizzjonijiet jistgħu jirriżultaw f'rati mnaqqsin ta' tkabbir.

6. Jistgħu jiżdiedu wkoll ċerti ċelloli ta' algi ħodor (eż. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) meta jissawru reċipjenti ġodda tal-koltura.

Tmigħ tal-adulti li jfeġġu

7. Ċerti sperimentaturi ssuġġerew li tajjara mxappa f'soluzzjoni tas-sukrożju saturat tista' sservi bħala ikel għal adulti li jfeġġu.

▼M6

Feġġa

8. F'20 ± 2 °C l-adulti ser jibdew ifeġġu mir-reċipjenti tat-trobbija tal-larva madwar 13 — 15-il jum wara. L-irġiel faċilment jingħarfu minħabba l-antenni piluži u l-ġisem irqiq tagħhom.

Mases bajd

9. Ladarba l-adulti jkunu preżenti fil-gaġġa tat-tgħammir, ir-reċipjenti kollha tat-trobbija tal-larva għandhom jiġu kkontrollati tliet darbiet fil-ġimgħa għal depożiti tal-mases bajd ġelatinuži. Jekk ikunu preżenti, il-mases bajd għandhom jitneħħew bil-galbu. Għandhom jiġu ttrasferiti f'dixx żgħir li fih kampjun tal-ilma tat-tgħammir. Il-mases bajd jintużaw biex jinbeda reċipjent ġdid tal-koltura (eż. 2- 4 mases bajd / reċipjent) jew jintużaw għal testijiet tat-tossiċità.

10. L-ewwel larva instar għandha tfaqqas wara jumejn — 3.

Tiswir ta' reċipjenti ġodda tal-koltura

11. Ladarba jiġu stabbiliti l-kolturi, għandu jkun possibbli li jissawwar reċipjent tal-koltura tal-larva frisk fil-ġimgħa jew inqas spiss skont ir-rekwiżiti tal-ittestjar, billi jitneħħew ir-reċipjenti l-qodma wara li jkunu feġġew l-insetti adulti. Bl-użu ta' din is-sistema, tiġi prodotta provvista regolari ta' adulti bl-inqas ħtieġa ta' ġestjoni.

Tħejjija tas-soluzzjonijiet tat-test “M4” u “M7”

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midju “M4”. Il-midjum “M7” jitħejja bħall-midjum “M4” ħlief għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom il-konċentrazzjonijiet huma erba' darbiet inqas fl-“M7” meta mqabbla mal-“M4”. Is-soluzzjoni tat-test ma għandhiex titħejja skont Elendt u Bias (1990) għall-konċentrazzjonijiet tal-$NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 u K_2HPO_4 mogħtijin għat-tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin, peress li dawn mhumiex adegwati.

Tħejjija tal-midjum “M7”

13. Kull soluzzjoni ewlenija (I) titħejja għaliha u soluzzjoni ewlenija kkombinata (II) titħejja minn dawn is-soluzzjonijiet ewlenin (I) (ara t-Tabella 1). Ħamsin ml mis-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II) u l-ammonti ta' kull soluzzjoni ewlenija tal-makronutrijenti li jingħataw fit-Tabella 2 fihom sa litru ilma dejonizzat biex jitħejja l-midjum “M7”. Soluzzjoni ewlenija tal-vitamini titħejja billi jiżdiedu tliet vitamini mal-ilma dejonizzat kif indikat fit-Tabella 3, u 0,1 ml soluzzjoni ewlenija tal-vitamini kkombinata tiżdied mal-midjum “M7” finali ftit qabel l-użu. Is-soluzzjoni ewlenija tal-vitamini tinħażen iffriżata f'alikwoti żgħar. Il-midjum jingħata l-arja u jiġi stabbilizzat.

Tabella 1

Soluzzjonijiet ewlenin tal-mikroelementi għall-midjum M4 u M7

Soluzzjonijiet ewlenin (I)	Ammont (mg) magħmul minn litru ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II): ħallat l-ammonti (ml) li ġejjin tas-soluzzjonijiet ewlenin (I) u tella' sa litru ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-test (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \times 4H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Soluzzjonijiet ewlenin (I)	Ammont (mg) magħmul minn litru ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II): ħallat l-ammonti (ml) li ġejjin tas-soluzzjonijiet ewlenin (I) u tella' sa litru ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-test (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \times 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \times 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \times 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \times 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \times 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dawn is-soluzzjonijiet ivarjaw f'M4 u M7, kif indikat iktar 'il fuq.
(2) Dawn is-soluzzjonijiet jitħejjew għalihom, imbagħad jitferrgħu flimkien u jiġu awtoklavati minnufih.

Tabella 2

Soluzzjonijiet ewlenin tal-mikronutrijenti għall-midjum M4 u M7

	Ammont magħmul minn litru ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjonijiet ewlenin tal-makronutrijenti miżjud biex jitħejja l-midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali fis-soluzzjonijiet ewlenin M4 u M7 (mg/L)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tabella 3

Soluzzjoni ewlenija tal-vitamini għall-midjum M4 u M7

It-tliet soluzzjonijiet tal-vitamini kollha huma kkombinati biex jifformaw soluzzjoni ewlenija waħda tal-vitamini.

	Ammont magħmul minn litru ilma dejonizzat (mg)	L-ammont ta' soluzzjoni ewlenija tal-vitamini miżjud biex jitħejja l-midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali fis-soluzzjonijiet ewlenin M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tjamin	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

REFERENZI

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

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna,* Water Research, 24: 1157-1167.

▼M6

Appendiċi 3

Tħejjija tan-naqal ifformulat

KOMPOŻIZZJONI TAN-NAQAL

Il-kompożizzjoni tan-naqal ifformulat għandha tkun kif ġej:

Kostitwent	Karatteristiċi	% tal-piż xott tan-naqal
Pit	Pit ta' sfanju, qrib il-pH 5,5-6,0 kemm jista' jkun, ma jifdal ebda pjanta viżibbli, mitħun sew (daqs tal-partikoli ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja	4 — 5
Ramel kwarzuż	Daqs tal-ħbub: > 50 % tal-partikoli għandhom ikunu fil-medda ta' 50-200 μm	75 — 76
Tafal tal-kawlina	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %	20
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda tal-pit u r-ramel	2 (± 0,5)
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$, pulverizzat, kimikament pur	0,05 — 0,1
Ilma	Kondottività ≤ 10 μS/cm	30 — 50

TĦEJJIJA

Il-pit jitnixxef bl-arja u mitħun għal trab irqiq. Tiġi ppreparata sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat permezz ta' apparat ta' omoġenizzazzjoni bi prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni huwa aġġustat għal 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni tiġi kkondizzjonata għal tal-inqas jumejn b'tħawwid bil-galbu f'20 ± 2 °C, sabiex tiġi stabbilizzata l-pH u jiġi stabbilit komponent mikrobjali stabbli. Il-pH terġa' titkejjel u għandha tkun ta' 6,0 ± 0,5. Imbagħad is-sospensjoni tal-pit titħallat ma' kosistwenti oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ilma dejonizzat biex jinkiseb naqal omoġenju b'kontenut ta' ilma f'medda ta' 30–50 fil-mija ta' piż xott tan-naqal. Il-pH tat-taħlita finali terġa' jitkejjel u jiġi aġġustat bejn 6,5 u 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun meħtieġ. Jittieħdu kampjuni tan-naqal biex jiġi ddeterminat il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Imbagħad, qabel ma jintuża fit-test tat-tossiċità tal-kironomidi, huwa rrakkomandat li n-naqal ifformulat jiġi kkondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet prevalenti fit-test sussegwenti.

ĦŻIN

Il-kostitwenti nixfin għat-tħejjija tan-naqal artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post xott u frisk f'temperatura tal-kamra. In-naqal ifformulat (imxarrab) ma għandux jinħażen qabel ma jintuża fit-test. Għandu jintuża minnufih wara perjodu ta' kundizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-tħejjija tiegħu.

REFERENZI

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

Appendiċi 4

Karatteristiċi tas-sustanzi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli

KOSTITWENT	KONĊENTRAZZJ-ONIJIET
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Ġebla bħal $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Kloru residwu	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

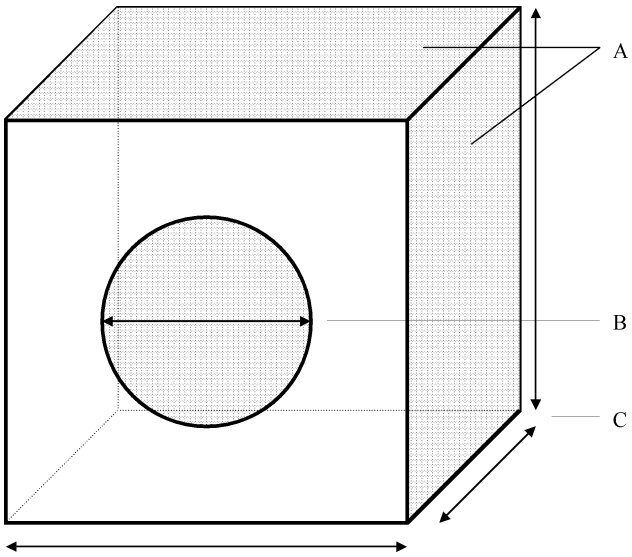
(*) Madankollu, ta' min jinnota li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija u s-sustanza kimika tat-test, għandu jintuża l-ilma bl-inqas ebusija (u b'hekk, il-Midjum M4 ta' Elendt ma għandux jintuża f'din is-sitwazzjoni).

▼**M6**

Appendiċi 5

Gwida għat-twettiq tat-test

Eżempju ta' gaġġa tat-tgħammir:



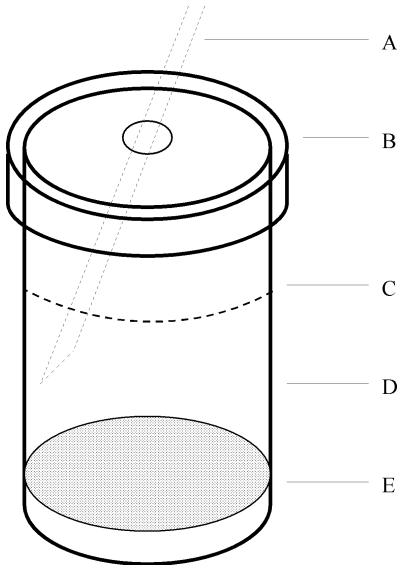
A: xibka fuq u tal-inqas waħda fil-ġenb tal-gaġġa (daqs tal-malja ta' madwar 1 mm)

B: fetħa għat-tqegħid tal-adulti li jfeġġu fil-gaġġa tat-tgħammir u sabiex jitneħħew iċ-ċwiemi bajd imbajdin mid-dixxijiet kristallizzanti (mhux murija f'din il-grafika)

C: daqs minimu tal-gaġġa tat-tgħammir: tul ta' 30 cm, għoli ta' 30 cm u wisgħa ta' 30 cm

▼**M6**

Eżempju ta' reċipjent tat-test:



A: pipetta Pasteur għall-provvista tal-arja fl-arja tal-madwar

B: għatu tal-ħġieġ biex jiġi evitat milli jaħarbu l-insetti

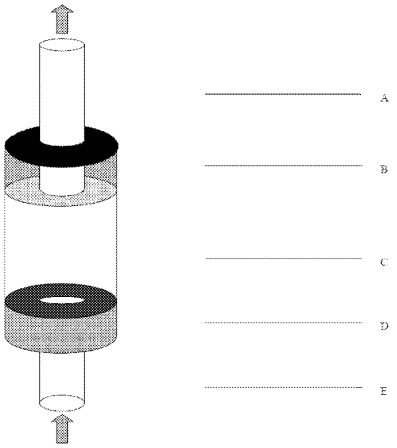
C: saff tal-wiċċ tal-ilma

D: reċipjent tat-test (bekk tal-ħġieġ tal-inqas ta' 600 ml)

E: saff tan-naqal

▼**M6**

Eżempju ta' eżawrient għall-qbid tal-insetti adulti (il-vleġeġ jindikaw id-direzzjoni tal-fluss tal-arja):



A: tubu tal-ħġieġ (dijametru intern ta' madwar 5 mm) imqabbad ma' pompa awtokarikata

B: tapp tas-sufra tal-lasktu vulkanizzat, perforat b'tubu tal-ħġieġ (A). Fuq ġewwa, il-feṫa tat-tubu tal-ħġieġ (A) titgħatta b'xi qoton u xibka (daqs tal-malja ta' madwar 1 mm) biex tiġi evitata ħsara lill-insetti meta jinġibdu fl-eżawrient

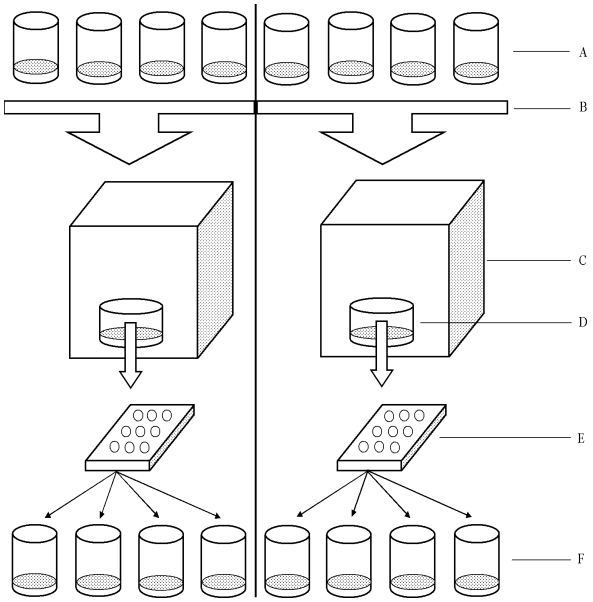
C: kontenitur trasparenti (plastik jew ħġieġ, tul ta' madwar 15-il cm) għall-insetti maqbudin

D: tapp tas-sufra tal-lasktu vulkanizzat, perforat b'tubu (E). Biex l-insetti jinħelsu fil-gaġġa tat-tgħammir, it-tapp tas-sufra D jinħall mill-kontenitur Ċ

E: tubu (plastik jew ħġieġ, dijametru ta' ġewwa ta' madwar 8 mm) biex l-insetti adulti jinġabru mir-reċipjent

▼**M6**

Preżentazzjoni skematika ta' test taċ-ċiklu tal-ħajja:



A: l-ewwel ġenerazzjoni — reċipjenti tat-test li fihom sistema ta' naqal-ilma, tmien irreplikati, 20 larva tal-ewwel instar għal kull reċipjent

B: erba' reċipjenti tat-test għal kull gaġġa tat-tgħammir, A u B

C: gaġeġ tat-tgħammir (A u B) għall-iffullar, it-tgħammir u l-ovipożizzjoni

D: dixxijiet kristallizzanti għad-depożitu ta' ċwiemi bajd

E: mikroplatti, toqba waħda għal kull ċima bajd

F: it-tieni ġenerazzjoni — reċipjenti tat-test li fihom sistema ta' naqal-ilma, tmien irreplikati, 20 larva tal-ewwel instar għal kull reċipjent.

▼M6

C.41. TEST TAL-IŻVILUPP SESSWALI TAL-ĦUT

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar (TG) 234 tal-OECD (2011). Huwa bbażat fuq deċiżjoni mill-1998 li jiġu żviluppati metodi ta' ttestjar ġodda jew li jiġu aġġornati dawk eżistenti għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali. It-Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut (FSDT) ġie identifikat bħala metodu ta' ttestjar promettenti li jkopri stadju sensittiv fil-ħajja tal-ħut risponsiv kemm għal sustanzi kimiċi li jibxhu lill-estroġen kif ukoll lill-androġen. Bejn l-2006 u l-2010 il-metodu ta' ttestjar sarlu eżerċizzju ta' validazzjoni interlaboratorja, li fih il-medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*), iż-żebra (*Danio rerio*) u l-ispinarell (*Gasterosteus aculeatus*) ġew ivvalidati u l-karpjun buras (*Pimephales promelas*) ġie parzjalment ivvalidat (41) (42) (43). Dan il-protokoll jinkludi l-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra. Fil-prinċipju, il-protokoll huwa tiswiħ tat-TG 210 tal-OECD "Fish, Early Life Stage Toxicity Test" (1), li fiha l-espożizzjoni titkompla sakemm il-ħut ikun sesswalment differenzjat, jiġifieri madwar 60 jum wara t-tifqis (dph) għall-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra (il-perjodu ta' espożizzjoni jista' jkun iqsar jew itwal għal speċijiet oħrajn li jiġu vvalidati fil-ġejjieni), u żdiedu punti ta' tmiem sensittivi għall-endokrina. L-FSDT jivvaluta l-effetti fl-istadju bikri tal-ħajja u l-konsegwenzi avversi potenzjali ta' sustanzi kimiċi li huma interferenti endokrinali putattivi (eż. estroġeni, androġeni u inibituri tal-isterojdoġenesi) fuq l-iżvilupp sesswali. It-taħlita taż-żewġ punti ta' tmiem ċentrali, il-konċentrazzjoni tal-vitelloġenina (VTG) u l-proporzjon tas-sessi fenotipiċi jippermettu sabiex it-test jindika l-modalità ta' azzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Minħabba l-bidla relevanti għall-popolazzjoni fil-proporzjon tas-sessi fenotipiċi, l-FSDT jista' jintuża għal valutazzjoni tal-perikli u r-riskji. Madankollu, jekk it-test jintuża għal valutazzjoni tal-perikli u r-riskji, ma għandux jintuża l-ispinarell għaliex id-dejta ta' validazzjoni disponibbli s'issa wriet li f'din l-ispeċi l-alterazzjonijiet tal-proporzjon tas-sessi fenotipiċi mis-sustanzi kimiċi tat-test ma kinux komuni.

2. Il-protokoll huwa msejjes fuq ħut espost bl-ilma għal sustanzi kimiċi matul il-perjodu tas-sess li fih il-ħut huwa mistenni jkun iktar sensittiv għall-effetti tas-sustanzi kimiċi li huma interferenti endokrinali li jxekklu l-iżvilupp sesswali. Jitkejlu żewġ punti ta' tmiem ċentrali bħala indikaturi ta' aberrazzjonijiet tal-iżvilupp assoċjati mal-endokrina, il-konċentrazzjonijiet tal-VTG u l-proporzjonijiet tas-sessi (proporzjonijiet tas-sessi) stabbiliti bl-istoloġija tal-gonadi. L-istopatoloġija gonadali (evalwazzjoni u sejbien tal-istadju tal-ooċiti u ċelloli spermatoġenetiċi) mhijiex obbligatorja. Barra minn hekk, is-sess ġenetiku huwa stabbilit kull meta jkun possibbli (eż. fil-medaka Ġappuniża u l-ispinarell). Il-preżenza ta' markatur tas-sess ġenetiku hija vantaġġ kbir peress li żżid is-saħħa tal-istatistiki tal-proporzjon tas-sessi u tippermetti li jiġi identifikat bdil lura tas-sess fenotipiku individwali. Punti ta' tmiem apikali oħrajn li għandhom jitkejlu jinkludu r-rata tat-tifqis, is-sopravivenza, it-tul u l-piż tal-ġisem. Il-metodu ta' ttestjar jista' jkun adattabbli għal speċijiet oħrajn minbarra dawk imsemmijin hawn fuq diment li l-ispeċijiet l-oħrajn issirilhom validazzjoni bħal dik li saret għall-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra, li l-ħut tal-kontroll ikunu sesswalment differenzjati fi tmiem it-test, li l-livelli tal-VTG ikunu għoljin biżżejjed biex jiġu identifikati varjazzjonijiet sinifikanti marbutin mas-sustanza kimika, u li s-sensittività tas-sistema tat-test tiġi stabbilita bl-użu ta' sustanzi kimiċi ta' referenza attivi fl-endokrina ((anti)-estroġeni, (anti)-androġeni, inibituri tal-aromataži eċċ). Barra minn hekk, kwalunkwe rapport ta' validazzjoni li jirreferi għal dejta tal-FSDT li tuża speċijiet oħrajn għandu jiġi rivedut mill-OECD, u l-eżitu tal-validazzjoni għandu jitqies sodisfaċenti.

▼M6

Kunsiderazzjonijiet inizjali u limitazzjonijiet

3. Normalment il-VTG tiġi prodotta mill-fwied tal-vertebrati oviparuži nisa bħala rispons għall-estroġen endoġenu ċirkolanti (2). Hija prekursur tal-proteini tal-isfar tal-bajd u, ladarba tiġi prodotta fil-fwied, tgħaddi mad-demm fl-ovarju, fejn tittieħed u tiġi mmodifikata mill-bajd fi żvilupp. Is-sinteži tal-VTG hija ferm limitata, għad li identifikabbli, f'ħut immatur u ħut irġiel adulti għaliex dawn ma għandhomx biżżejjed estroġen ċirkolanti. Madankollu, il-fwied kapaċi jissintetizza u jnixxi VTG bħala rispons għal stimulazzjoni tal-estroġen esoġena (3) (4) (5).

4. Il-kejl tal-VTG iservi għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi b'modalitajiet ta' azzjoni estroġeniċi, antiestroġeniċi u androġeniċi u sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-isterojdoġenesi bħal pereżempju inibituri tal-aromataži. L-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi estroġeniċi hija possibbli bil-kejl tat-tidħil tal-VTG f'ħut irġiel, u din ġiet iddokumentata ħafna f'tagħrif xjentifiku evalwat bejn il-pari. L-induzzjoni tal-VTG intweriet wara l-espożizzjoni għal androġeni aromatizzabbli wkoll (6) (7). Tnaqqis fil-livell ċirkolanti tal-estroġen fin-nisa, pereżempju bl-inibizzjoni tal-aromataži li tikkonverti l-androġen endoġenuż fl-estroġen naturali 17β-oestradjol, jikkaġuna tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-VTG, li tintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi bi karatteristiċi li jinibixxu l-aromataži jew inibituri tal-isterojdoġenesi b'mod iktar mifrux (33). Ir-relevanza bijoloġika tar-rispons tal-VTG wara inibizzjoni estroġenika/tal-aromataži hija stabbilita u ġiet iddokumentata sew (8) (9). Madankollu, huwa possibbli li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tista' tiġi affettwata mit-tossiċità ġenerali u l-modalitajiet ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali.

5. Ġew żviluppati u standaridzzati b'suċċess bosta metodi ta' kejl għall-użu b'rutina sabiex il-VTG tiġi kkwantifikata f'kampjuni tad-demm, il-fwied, il-ġisem sħiħ jew l-omoġenati tar-ras/tad-denb miġburin minn ħut individwali. Dan huwa l-każ għaż-żebra, l-ispinarell u l-medaka Ġappuniża u anki l-ispeċi parzjalment ivvalidata karpjun buras; il-metodi speċifiċi għall-ispeċi tal-Assaġġ tal-Immunosorbenti Marbut mal-Enżimi (ELISA) li jużaw l-immunokimika għall-kwantifikazzjoni tal-VTG huma disponibbli (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Fil-medaka Ġappuniża u ż-żebra, hemm korrelazzjoni tajba bejn il-VTG imkejla minn kampjuni tal-plażma tad-demm, il-fwied u l-omoġenati għad li l-omoġenati għandhom tendenza li juru valuri ftit inqas minn plażma (17) (18) (19). L-Appendiċi 5 jipprovdi l-proċeduri rrakkomandati għall-ġbir tal-kampjuni għal analiżi tal-VTG.

6. Bidla fil-proporzjon tas-sessi fenotipiċi (proporzjonijiet tas-sessi) hija punt ta' tmiem li jirrifletti bidla lura fis-sess. Fil-prinċipju, sustanzi kimiċi li jinibixxu estroġeni, antiestroġeni, androġeni, antiandroġeni u sterojdoġenesi jistgħu jaffettwaw il-proporzjon tas-sessi tal-ħut fi żvilupp (20). Intwera li din il-bidla lura tas-sess hija parzjalment riversibbli fiż-żebra (21) wara espożizzjoni għas-sustanza kimika li tixbah l-estroġen, filwaqt li l-bidla lura tas-sess wara espożizzjoni għas-sustanza kimika li tixbah l-androġen hija permanenti (30). Is-sess huwa ddefinit bħala mara, raġel, interess (kemm ooċiti kif ukoll ċelloli spermatoġeniċi f'gonada waħda) jew mhux differenzjat, stabbilit f'ħut individwali permezz ta' eżaminazzjoni istoloġika tal-gonadi. Tingħata gwida fl-Appendiċi 7 u fl-"OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads" (22).

7. Is-sess ġenetiku huwa eżaminat permezz ta' markaturi ġenetiċi meta jkunu jeżistu fi speċi partikolari tal-ħut. Fil-medaka Ġappuniża, il-ġeni XX tan-nisa jew XY tal-irġiel jistgħu jiġu identifikati bir-Reazzjoni Katina tal-Polimeraži (PCR),

▼M6

jew inkella l-ġene tad-dominju DM marbut mal-Y (DMY) jista' jiġi analizzat (negattiv jew pożittiv għad-DMY) kif deskritt fi (23) (24). Fl-isprinarell, hemm metodu ekwivalenti tal-PCR sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku deskritt fl-Appendiċi 10. Meta s-sess ġenetiku jkun jista' jintrabat b'mod individwali għas-sess fenotipiku, is-saħħa tat-test titjieb u għaldaqstant is-sess ġenetiku għandu jiġi stabbilit fi speċijiet b'markaturi tas-sess ġenetiku ddokumentati.

8. Iż-żewġ punti ta' tmiem endokrinali ċentrali, il-VTG u l-proprozjon tas-sess, flimkien, jistgħu juru l-modalità ta' azzjoni endokrinali (MOA) tas-sustanza kimika (Tabella 1). Il-proporzjon tas-sessi huwa bijomarkatur relevanti għall-popolazzjoni (25) (26) u għal ċerti modalitajiet ta' azzjoni ddefiniti sew, ir-riżultati tal-FSDT jistgħu jintużaw għal skopijiet ta' valutazzjoni tal-perikli u r-riskji meta dan jitqies xieraq mill-aġenzija regolatorja. Bħalissa, dawn il-modalitajiet ta' azzjoni huma estroġeni, androġeni u inibituri tal-isterojdoġenesi.

Tabella 1

Reazzjoni tal-punti ta' tmiem endokrinali għal modalitajiet ta' azzjoni differenti tas-sustanzi kimiċi:

↑ = f'żieda, ↓=fi tnaqqis, — = mhux investigati

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Proporzjon tas-sessi	Referenzi
Agonist dgħajjef tal-estroġen	↑	↑	↑♀ jew ↑Mhux diff	(27) (40)
Agonist b'saħħtu tal-estroġen	↑	↑	↑♀ jew ↑Mhux diff, Le ♂	(28) (40)
Antagonist tal-estroġen	—	—	↓♀, ↑ Mhux diff.	(29)
Agonist tal-androġen	↓ jew —	↓ jew —	↑ ♂, Le ♀	(28) (30)
Antagonist tal-androġen	—	—	↑♀ Intersess	(31)
Inibitur tal-Aromataži	↓	↓	↓♀	(33)

9. L-FSDT ma jkoprix l-istadju riproduttiv tal-ħajja tal-ħut u, għaldaqstant, is-sustanzi kimiċi li huma ssuspettati li jaffettwaw ir-riproduzzjoni f'konċentrazzjonijiet inqas mill-iżvilupp sesswali għandhom jiġu eżaminati f'test li jkopri r-riproduzzjoni.

10. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet għall-fini ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

11. L-FSDT *in vivo* huwa maħsub sabiex jidentifika sustanzi kimiċi bi karatteristiċi androġeniċi u estroġeniċi kif ukoll karatteristiċi li jinibixxu antiandroġeni, antiestroġeni u sterejdoġenesi. Il-fażijiet ta' validazzjoni tal-FSDT (1 u 2) koprew sustanzi kimiċi li jinibixxu estroġeni, androġeni u sterojdoġenesi. L-effetti fl-FSDT ta' antagonisti tal-estroġen u l-androġen jistgħu jinkisbu mit-Tabella 1 iżda dawn l-MOA huma inqas iddokumentati bħalissa.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Fit-test, il-ħut huwa espost, minn bajd iffertilizzat ġdid sat-tlestija tad-differenzazzjoni sesswali, għal tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test dissolta fl-ilma. Il-kundizzjonijiet tat-test għandhom ikunu bi fluss kontinwu sakemm dan ma jkunx possibbli minħabba d-disponibilità jew l-għamla (eż. solubilità limitata) tas-sustanza kimika tat-test. It-test jibda billi l-bajd iffertilizzat ġdid (qabel il-qasma tal-blastodiska) jitqiegħed fil-kompartimenti tat-test. It-tagħbija tal-kompartimenti hija deskritta għal kull

▼M6

speċi fil-paragrafu 27. Għall-ispeċijiet tal-ħut ivvalidati, il-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra, it-test jintemm f'60 dph. Fi tmiem it-test, il-ħut kollu jiġi ewtanizzat b'mod dinjituż. Kampjun bijoloġiku (plażma tad-demm, fwied jew omoġenat tar-ras/tad-denb) jinġabar għal analiżi tal-VTG minn kull ħuta u l-parti li jifdal tiġi ffissata għal evalwazzjoni istoloġika tal-gonadi sabiex jiġi stabbilit is-sess fenotipiku; tista' ssir istopatoloġija (eż. sejbien tal-istadju tal-gonadi, severità tal-interess). Fi speċijiet li għandhom il-markaturi xierqa jittieħed kampjun bijoloġiku (il-pinna anali jew dorsali) sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku (Appendiċijiet 9 u 10).

13. Ħarsa ġenerali lejn il-kundizzjonijiet relevanti tat-test għal speċijiet ivvalidati: Il-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

14. Ir-riżultati minn test tat-tossiċità akuta jew assaġġ ieħor tat-tossiċità fuq terminu qasir [eż. il-metodu ta' ttestjar C.14 (34) u it-TG 210 tal-OECD (1)], li idealment isir bl-ispeċijiet magħżulin għal dan it-test, għandhom ikunu disponibbli. Dan jimplika li s-solubilità fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test huma magħrufin u huwa disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fil-kompartimenti tat-test, bi preċiżjoni magħrufa u rrapportata u limitu tal-identifikazzjoni.

15. Informazzjoni siewja oħra tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza kimika, l-istabbiltà fl-ilma u d-dawl, pKa, P_{ow} u r-riżultati ta' test għal bijodegradabilità lesta (Metodu ta' Ttestjar C.4) (35).

Kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test

16. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun tal-inqas 60 fil-mija tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV) tul it-test;

— It-temperatura tal-arja ma għandhiex tvarja b'iktar minn ± 1,5 °C bejn il-kompartimenti tat-test fi kwalunkwe ħin matul il-perjodu ta' espożizzjoni u trid tinżamm fi ħdan il-meded tat-temperatura speċifikati għall-ispeċijiet tat-test (Appendiċi 2);

— Metodu vvalidat għall-analiżi tas-sustanza kimika ta' espożizzjoni b'limitu ta' detezzjoni ferm inqas mill-inqas konċentrazzjoni nominali għandu jkun disponibbli u għandha tinġabar evidenza sabiex jintwera li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni nżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medjin imkejlin;

— Is-sopravivenza ġenerali tal-bajd iffertilizzat fil-kontrolli u, meta relevanti, fil-kontrolli bis-solvent, għandha tkun ikbar minn jew daqs il-limiti ddefiniti fl-Appendiċi 2;

— Il-kriterji ta' aċċettazzjoni marbutin mat-tkabbir u l-proporzjonijiet tas-sess fi tmiem it-test huma bbażati fuq dejta mill-gruppi tal-kontroll (kontroll bl-ilma u s-solvent kollettivi sakemm ma jvarjawx ħafna, f'liema każ solvent biss):

▼M6

		Medaka Ġappuniża	Żebra	Spinarell
Tkabbir	Piż imxarrab tal-ħut, imnixxef bit-taptip	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Tul (tul standard)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

— Meta jintuża solvent, dan ma għandu jkollu ebda effett statistikament sinifikanti fuq is-sopravivenza u ma għandux jipproduċi xi effett ta' interferent endokrinali jew xi effett avvers ieħor fuq l-istadji bikrin tal-ħajja li jinstabu minn kontroll bis-solvent.

Jekk tiġi osservata devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tad-dejta tat-test u dawn il-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapportar.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Kompartimenti tat-test

17. Jista' jintuża kwalunkwe kompartiment tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli jew xi kompartiment ieħor kimikament inert. Id-dimensjonijiet tal-kompartimenti għandhom ikunu kbar biżżejjed biex tinżamm konformità mal-kriterji dwar ir-rata ta' tagħbija mogħtijin hawn taħt. Idealment, il-kompartimenti tat-test jitqiegħdu f'pożizzjoni għal għarrieda fiż-żona tat-test. Disinn għal għarrieda tal-blokok b'kull konċentrazzjoni preżenti f'kull blokka huwa ppreferut meta mqabbel ma' disinn kompletament għal għarrieda. Il-kompartimenti tat-test għandhom ikunu protetti minn disturbanza mhux mixtieqa.

Għażla tal-ispeċijiet

18. L-ispeċijiet irrakkomandati tal-ħut jingħataw fl-Appendiċi 2. Il-proċeduri għall-inklużjoni ta' speċijiet ġodda jingħataw fil-paragrafu 2.

Iż-żamma tal-ħut ġenituri

19. Id-dettalji dwar iż-żamma tal-ħut ġenituri f'kundizzjonijiet sodisfaċenti jistgħu jinkisbu mit-TG 210 tal-OECD(1). Il-ħut ġenituri għandhom jintemgħu darba jew darbtejn kuljum b'ikel xieraq.

Tqandil ta' embrijuni u larva

20. Għall-ewwel, l-embrijuni u l-larva jistgħu jiġu esposti fi ħdan kompartiment ewlieni f'komponenti tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli, mgħammrin bi xbieki fil-ġenb jew fit-truf biex ikun hemm fluss tas-sustanza kimika tat-test fi ħdan il-komponent. Fluss mhux turbolenti fi ħdan dawn il-kompartimenti żgħar jista' jiġi indott billi jiġu sospiżi minn fergħa mqiegħda biex il-kompartiment jiċċaqlaq 'il fuq u 'l isfel filwaqt li l-organiżmi jibqgħu mgħaddsin.

21. Meta jkunu intużaw kontenituri tal-bajd, grilji jew xbieki biex il-bajd jinżamm fi ħdan il-kompartiment ewlieni tat-test, dawn ir-restrizzjonijiet għandhom jitneħħew wara li tfaqqas il-larva, ħlief li x-xbieki għandhom jinżammu biex jiġi evitat milli jaħrab il-ħut. Jekk ikun hemm bżonn li tiġi ttrasferita l-larva, din ma għandhiex tkun esposta għall-arja u ma għandhomx jintużaw xbieki biex il-ħut jinħeles minn kontenituri tal-bajd. It-twaqqit ta' dan it-trasferiment ivarja skont l-ispeċijiet u mhux bilfors dejjem ikun hemm bżonn isir trasferiment.

▼M6

Ilma

22. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test turi sopravivenza bil-kontroll li tal-inqas tkun tajba daqs fl-ilma deskritta fl-Appendiċi 3 huwa xieraq bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Sabiex jiġi żgurat li l-lima ta' dilwizzjoni mhuwiex ser ikollu influwenza żejda fuq ir-riżultat tat-test (pereżempju b'reazzjoni mas-sustanza kimika tat-test) jew jaffettwa b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk tad-duqqajs, għandhom jittieħdu kampjuni f'intervalli għal analiżi. Il-karbonju organiku totali, il-konduttività, il-pH u s-solidi sospiżi għandhom jitkejlu, pereżempju kull tliet xhur meta l-ilma ta' dilwizzjoni jkun magħruf li huwa ta' kwalità relattivament kostanti. Għandhom isiru kejliet tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni l-kbar (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) u l-pestiċidi, jekk ikun hemm dubji dwar il-kwalità tal-ilma. Id-dettalji dwar analiżi kimika u l-ġbir tal-ilma jistgħu jinkisbu mill-paragrafu 34.

Soluzzjonijiet tat-test

23. Jekk dan ikun possibbli fil-prattika, għandha tintuża sistema bi fluss kontinwu. Għal testijiet bi fluss kontinwu, sistema b'distribuzzjoni u dilwizzjoni kontinwi ta' soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompa tal-kejl, u sistema ta' saturatur) hija meħtieġa sabiex tiddaħħal sensiela ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-ilma ta' dilwizzjoni għandhom jiġu kkontrollati f'ċerti intervalli matul it-test u ma għandhomx ivarjaw b'iktar minn 10 % matul it-test. Instab li rata tal-fluss ekwivalenti għal tal-inqas ħames volumi tal-kompartimenti tat-test kull 24 siegħa hija xierqa (1). Għandha tingħat attenzjoni sabiex jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik jew materjali oħrajn, u wħud minnhom jista' jkun fihom sustanzi kimiċi bijoloġikament attivi jew jistgħu jassorbu s-sustanza kimika tat-test.

24. Idealment, is-soluzzjoni ewlenija għandha titħejja mingħajr l-użu ta' solventi permezz ta' sempliċi taħlit jew ċaqliq tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. tħawwid jew ultrasonikazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test diffiċli biex tinħall fl-ilma, għandhom jiġu segwiti l-proċeduri deskritti fl-OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (36). L-użu ta' solventi għandu jiġi evitat iżda jista' jkun meħtieġ f'ċerti każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif suppost. Eżempji ta' solventi xierqa jingħataw f'(36).

25. Għandhom jiġu evitati kundizzjonijiet tat-test semistatiċi sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għar-raġunijiet validi assoċjati mas-sustanza kimika tat-test (eż. stabbiltà, disponibilità limitata, spejjeż għoljin jew perikli). Għat-teknika semistatika, jistgħu jiġu segwiti żewġ proċeduri differenti ta' tiġdid. Is-soluzzjonijiet tat-test il-ġodda jitħejjew f'kompartimenti nodfa u bajd sopravissuti u larva ttrasferita bil-galbu fil-kompartimenti l-ġodda, jew l-organiżmi tat-test jinżammu fil-kompartimenti tat-test filwaqt li kuljum jinbidel proporzjon (tal-inqas żewġ terzi) mill-ilma tat-test.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tal-Espożizzjoni

Ġbir tal-bajd u d-durata

26. Biex jiġi evitat preġudizzju ġenetiku, il-bajd jinġabar minn tal-inqas tliet pari jew gruppi tat-tgħammir, imħalltin u magħżulin għal għarrieda biex jinbeda t-test. Għall-ispinarell, ara d-deskrizzjoni tal-fertilizzazzjoni artifiċjali fl-Appendiċi 11. It-test għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara li jkun

▼M6

ġie ffertilizzat il-bajd, idealment filwaqt li l-embrijuni jitgħaddsu fis-soluzzjonijiet tat-test qabel tibda l-qasma blastodiska, jew ftit kemm jista' jkun wara dan l-istadju u mhux iktar tard minn 12-il siegħa wara l-fertilizzazzjoni. It-test għandu jkompli sakemm titlesta d-differenzazzjoni sesswali fil-grupp bil-kontroll (60 dph għall-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra).

Tagħbija

27. In-numru ta' bajd iffertilizzat fil-bidu tat-test għandu jkun tal-inqas 120 għal kull konċentrazzjoni maqsum bejn tal-inqas 4 irreplikati (allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontroll hija aċċettata). Il-bajd għandu jitqassam għal għarrieda (bl-użu ta' tabelli statistiċi għal każwalizzazzjoni) bejn it-trattamenti. Ir-rata tat-tagħbija (għad-definizzjoni, ara l-Appendiċi 1) għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex tkun tista' tinżamm konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt ta' tal-inqas 60 % tal-ASV mingħajr ma tingħata arja diretta fil-kompartimenti. Għal testijiet bi fluss kontinwu, hija rrakkomandata rata tat-tagħbija li ma taqbiżx iż-0,5 g/l f'24 siegħa, u li ma taqbiżx il-5 g/l tas-soluzzjoni fi kwalunkwe ħin. Xejn iktar tard minn 28 jum wara l-fertilizzazzjoni, in-numru ta' ħut għal kull irreplikat għandu jerġa' jiġi distribwit, b'tali mod li kull irreplikat ikun fih numru kemm jista' jkun indaqs ta' ħut. Jekk isseħħ mortalità relatata mal-espożizzjoni, in-numru ta' rreplikati għandu jitnaqqas kif xieraq b'tali mod li d-densità tal-ħut bejn il-livelli tat-trattament jinżamm indaqs kemm jista' jkun.

Dawl u temperatura

28. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu xierqa għall-ispeċijiet tat-test (ara l-Appendiċi 2 għall-kundizzjonijiet sperimentali għall-FSDT).

Tmigħ

29. L-ikel u t-tmigħ huma kritiċi, u huwa essenzjali li jingħata l-ikel it-tajjeb għal kull stadju f'intervalli xierqa ta' ħin u f'livell biżżejjed sabiex isostni t-tkabbir normali. It-tmigħ għandu jkun *ad libitum* filwaqt li jiġi minimizzat l-eċċess. Biex tinkiseb rata biżżejjed tat-tkabbir, il-ħut għandu jintema' tal-inqas darbtejn kuljum (aċċettat darba kuljum fi tmiem il-ġimgħa), b'intervall minimu ta' tliet sigħat bejn kull tmigħ. Għandhom jitneħħew ikel u rawt żejda, skont kif ikun hemm bżonn, sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni ta' skart. Hi u tinkiseb esperjenza, l-ikel u r-reġimi tat-tmigħ ikomplu jiġu rfinati sabiex titjieb is-sopravivenza u jiġi ottimizzat it-tkabbir. Għaldaqstant għandu jsir sforz sabiex jiġi kkonfermat ir-reġim propost ma' esperti rikonoxxuti. It-tmigħ għandu jiġi pprojbit 24 siegħa qabel jinetmm it-test. Eżempji ta' oġġetti xierqa tal-ikel huma elenkati fl-Appendiċi 2 (ara wkoll l-OECD Fish Testing Framework (39).

Konċentrazzjonijiet tat-test

30. Is-sustanzi kimiċi tat-test huma spazjati kif deskritt fl-Appendiċi 4. Tal-inqas għandhom jintużaw tliet konċentrazzjonijiet tat-test f'tal-inqas erba' rreplikati. Il-kurva li tirrelata l-LC_{50} ma' perjodu ta' espożizzjoni fl-istudji akuti disponibbli għandha tiġi kkunsidrata meta tingħażel il-medda ta' konċentrazzjonijiet tat-test. Huma rrakkomandati ħames konċentrazzjonijiet tat-test jekk għandha tintuża d-dejta għall-valutazzjoni tar-riskju.

31. Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika ogħla minn 10 % tal-LC_{50} akuta fl-adulti jew 10 mg/l, tkun liema tkun l-inqas waħda, ma għandhomx bżonn jiġu ttestjati. Il-konċentrazzjoni massima tat-test għandha tkun 10 % tal-LC_{50} fl-istadju tal-ħajja tal-larva/taż-żgħar.

▼M6

Kontrolli

32. Għandu jsir kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni (≥ 4 irreplikati) u, jekk relevanti, kontroll bis-solvent (≥ 4 irreplikati) minbarra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Fit-test għandhom jintużaw biss solventi li ġew investigati u li ma għandhom ebda influwenza statistikament sinifikanti fuq il-punti ta' tmiem tat-test.

33. Meta jintuża solvent, il-konċentrazzjoni finali tiegħu ma għandhiex tkun ikbar minn 0,1 ml/l (36) u għandha tkun l-istess konċentrazzjoni fil-kompartimenti kollha tat-test, ħlief il-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Madankollu, għandu jsir kull sforz sabiex jiġi evitat l-użu tat-tali solvent jew sabiex jinżammu konċentrazzjonijiet tas-solvent għall-minimu possibbli.

Frekwenza tad-Determinazzjonijiet Analitiċi u l-Kejliet.

34. Għandha ssir analiżi kimika tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test qabel ma jibda t-test sabiex tiġi vverifikata l-konformità mal-kriterji ta' aċċettazzjoni. L-irreplikati kollha għandhom jiġu analizzati għalihom fil-bidu u fi tmiem it-test. Tal-inqas darba fil-ġimgħa għandu jiġi analizzat irreplikat wieħed għal kull konċentrazzjoni tat-test matul it-test, b'bidla sistematika bejn l-irreplikati (1,2,3,4,1,2 …). Jekk il-kampjuni jinħażnu sabiex jiġu analizzati iktar tard, il-metodu ta' ħżin tal-kampjuni għandu jiġi vvalidat minn qabel. Il-kampjuni għandhom jiġu ffiltrati (eż. bl-użu ta' daqs ta' 0,45 μm tal-pori) jew iċċentrifugati sabiex jiġi żgurat li jsiru determinazzjonijiet fuq is-sustanza kimika f'soluzzjoni vera.

35. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, il-pH, l-ebusija totali, il-konduttività, is-salinità (jekk relevanti), u t-temperatura għandhom jitkejlu fil-kompartimenti kollha tat-test. Tal-inqas, l-ossiġenu dissolt, is-salinità (jekk relevanti), u t-temperatura għandhom jitkejlu kull ġimgħa, u l-pH, il-kondottività u l-ebusija fil-bidu u fi tmiem it-test. Idealment, it-temperatura għandha titkejjel kontinwament f'tal-inqas kompartiment wieħed tat-test.

36. Ir-riżultati għandhom ikunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejlin. Madankollu, jekk il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni tinżamm b'mod sodisfaċenti fi ħdan ±20 % tal-konċentrazzjoni nominali tul it-test sħiħ, f'dak il-każ ir-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri nominali jew inkella mkejlin.

Osservazzjonijiet u kejliet

Stadju tal-iżvilupp embrijoniku

37. L-espożizzjoni għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara l-fertilizzazzjoni u qabel tibda l-qasma blastodiska u mhux iktar minn 12-il siegħa wara l-fertilizzazzjoni sabiex tiġi żgurata espożizzjoni matul l-iżvilupp embrijoniku bikri.

Tifqis u sopravivenza

38. Osservazzjonijiet fuq it-tifqis u s-sopravivenza għandhom isiru tal-inqas darba kuljum u n-numri jridu jiġu rreġistrati. Embrijuni, larva u ħut żgħir mejtin għandhom jitneħħew malli jiġu osservati peress li jistgħu jitmermru malajr u jistgħu jiġu disaggregati skont l-azzjonijiet tal-ħut l-ieħor. Għandha tingħata attenzjoni kbira meta jitneħħew l-individwi mejtin sabiex ma jintlaqtux u lanqas ma ssir ħsara fiżika fuq bajd/larva fil-qrib, peress li dawn huma estremament delikati u sensittivi. Il-kriterji għall-mewt ivarjaw skont l-istadju tal-ħajja:

— għall-bajd: b'mod partikolari fl-istadji bikrin, telf qawwi fit-translużenza u l-bidla fil-kolorazzjoni, ikkaġunat minn koagolazzjoni u/jew preċipitazzjoni tal-proteina, li jwasslu għal dehra opaka bajda;

▼M6

— għal larva u ħut żgħir: immobilità u/jew nuqqas ta' ċaqliq respiratorju u/jew nuqqas ta' taħbit il-qalb u/jew kolorazzjoni opaka bajda tas-sistema nervuża ċentrali u/jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimoli mekkaniċi.

Dehra anormali

39. In-numru ta' larva jew ħut li juri anormalità fil-forma tal-ġisem għandu jiġi rreġistrat, u d-dehra u l-għamla tal-anormalità deskritta. Ta' min jinnota li embrijuni u larva anormali jseħħu b'mod naturali u jistgħu jkunu fl-ordni ta' perċentwal kbir fil-kontroll(i) f'ċerti speċijiet. Annimali anormali għandhom jitneħħew biss mill-kompartimenti tat-test meta jmutu. Madankollu, skont id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi, jekk l-anormalitajiet jirriżultaw f'uġigħ, tbatija u diffikultà jew ħsara dejjiema, u l-mewt tista' titbassar b'mod affidabbli, l-annimali għandhom jiġu anestetizzati u ewtanizzati skont id-deskrizzjoni fil-paragrafu 44 u ttrattati bħala mortalità għall-analiżi tad-dejta.

Imġiba anormali

40. Anormalitajiet, eż. iperventilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, trankwillità atipika u mġiba atipika tat-tmigħ għandhom jiġu rreġistrati malli jidhru.

Piż

41. Fi tmiem it-test, il-ħut kollu li jkun għadu ħaj għandu jiġi ewtanizzat (anestetizzat jekk għandhom jittieħdu kampjuni tad-demm), u għandu jintiżen il-piż imxarrab individwali (imnixxef bit-taptip).

Tul

42. Fi tmiem it-test, għandu jitkejjel it-tul individwali (tul standard).

43. Dawn l-osservazzjonijiet ser jirriżultaw fid-dejta kollha li ġejja jew parti minnha disponibbli għar-rapportar:

— il-mortalità kumulattiva;

— in-numri ta' ħut b'saħħtu fi tmiem it-test;

— iż-żmien sal-bidu tat-tifqis u tmiem it-tifqis;

— it-tul u l-piż tal-annimali li għadhom ħajjin;

— in-numri ta' larva sfigurata;

— in-numri ta' ħut li jesibixxi mġiba anormali.

Kampjunar tal-ħut

44. Il-kampjunar tal-ħut isir fi tmiem it-test. Il-ħut fil-kampjun għandu jiġi ewtanizzat b'eż. MS-222 (100-500 mg għal kull l ibbaferjat b'200 mg $NaHCO_3$ għal kull l) jew FA-100 (4-allil-2-metossifenol: ewġenol) u jitkejjel u jintiżen bħala piż nett (imnixxef bit-taptip) jew anestetizzat jekk għandu jittieħed kampjun tad-demm (ara l-paragrafu 49).

Kampjunar għall-analiżi tal-VTG u determinazzjoni tas-sess permezz ta' evalwazzjoni istoloġika

45. Il-ħut kollu għandu jiġi kampjunat u jitħejja għal analiżi tas-sess u l-VTG. Il-ħut kollu għandu jiġi analizzat istikoloġikament sabiex jiġi ddeterminat is-sess. Għall-kejliet tal-VTG, huwa aċċettat subkampjunar ta' tal-inqas 16-il

▼**M6**

ħuta minn kull irreplikat. Għandu jiġi analizzat iktar ħut għall-VTG jekk ir-riżultati tas-subkampjunar ma jkunx ċar.

46. Il-proċedura ta' kampjunar għall-VTG u l-istabbiliment tas-sess jiddependu mill-metodu ta' analiżi tal-VTG:

Metodu tal-omoġenat tar-ras/tad-denb għal analiżi tal-VTG

47. Il-ħut huwa ewtanizzat. Ir-ras u d-denb ta' kull ħuta huma sseparati mill-ġisem tal-ħut permezz ta' qatgħat li jsiru eżatt wara l-pinen pettorali, u eżatt wara l-pinna dorsali, bl-użu ta' sikkinka kirurġika (Ara l-Figura 1). Il-parti tar-ras u d-denb minn kull ħuta jinġabru flimkien, jintiżnu u jingħataw numru individwali, jiġu ffriżati f'nitroġenu likwidu u jinħażnu f'-70^{o} jew inqas għala analiżi tal-VTG. Il-parti tal-ġisem tal-ħut tingħata numru u tiġi stabbilita f'fissattiv xieraq għal evalwazzjoni istoloġika (22). Bl-użu ta' dan il-metodu, il-VTG u l-istopatoloġija jiġu evalwati fuq kull individwu u, b'hekk, bidla possibbli fil-livell tal-VTG tista' tkun relatata mas-sess fenotipiku tal-ħut jew is-sess ġenetiku (il-medaka Ġappuniża u l-ispinarell) tal-ħut. Għal iktar informazzjoni, ara l-gwida għall-omoġenizzazzjoni (Appendiċi 5) u gwida għall-kwantifikazzjoni tal-VTG (Appendiċi 6).

Metodu ta' omoġenat tal-fwied għal analiżi tal-VTG

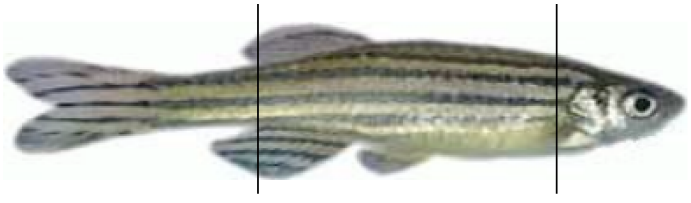
48. Il-ħut jiġi ewtanizzat. Il-fwiet jinqata' u jinħażen f'– 70 °C jew inqas. Il-proċeduri rrakkomandati għal qtugħ tal-fwied u pretrattament huma disponibbli fit-TG 229 tal-OECD (37) jew il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness (38). Imbagħad, il-fwied jiġi omoġenizzat b'mod individwali kif deskritt fit-TG 229 tal-OECD jew il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness. Is-supernatant miġbur jintuża għall-kejl tal-VTG b'teknika ELISA omologa (ara l-Appendiċi 6 għal eżempju ta' kwantifikazzjoni fiż-żebra jew it-TG 229 tal-OECD (37) għal medaka Ġappuniża). Skont dan l-approċċ, huwa possibbli wkoll li jkun hemm dejta tal-ħut individwali kemm fuq il-VTG kif ukoll l-istoloġija tal-gonadi.

Il-metodu tal-plażma tad-demm għal analiżi tal-VTG

49. Id-demm jinġabar mill-ħut anestetizzat b'titqib kardijaku, vina kawdali jew qtugħ tad-denb, u jiġi ċċentrifugat f'4 °C għall-ġbir tal-plażma. Il-plażma tinħażen f'70 °C jew inqas sal-użu. Il-ħut sħiħ jiġi ewtanizzat u ffissat għal istoloġija. Kemm il-kampjuni tal-plażma kif ukoll il-ħut jingħataw numru individwali sabiex il-livelli tal-VTG jiġu relatati mas-sess tal-ħut.

Figura 1

Kif taqta' ħuta għall-kejl tal-VTG fl-omoġenat tar-ras/tad-denb u l-evalwazzjoni istoloġika tas-sezzjoni tan-nofs



Aqta' minn wara l-pinna dorsali Aqta' minn wara l-pinna pettorali

▼M6

Determinazzjoni tas-sess ġenetiku

50. Jittieħed kampjun bijoloġiku għad-determinazzjoni tas-sess ġenetiku minn ħuta individwali fi speċijiet li għandhom markaturi xierqa. Għal medaka Ġappuniża, tinġabar il-pinna anali jew dorsali. Tingħata deskrizzjoni ddettaljata fl-Appendiċi 9 inkluż il-kampjunar tat-tessut u d-determinazzjoni tas-sess b'metodu tal-PCR. Bl-istess mod, għall-ispinarella, fl-Appendiċi 10 tingħata deskrizzjoni tal-kampjunar tat-tessuti u metodu tal-PCR li jistabbilixxi s-sess.

Kejl tal-VTG

51. Il-kejl tal-VTG għandu jkun ibbażat fuq metodu kwantitattiv u analitikament ivvalidat. L-informazzjoni għandha tkun disponibbili fuq il-varjabbiltà intrassaġġ u interassaġġ tal-metodu użat f'laboratorju partikolari. Is-sors tal-varjabbiltà interlaboratorja u intralaboratorja hija (ferm probabbli) ibbażata fuq l-istadji differenti tal-iżvilupp tal-popolazzjoni tal-ħut. Minħabba l-varjabbiltà tal-kejl tal-VTG, l-NOECs ibbażati fuq dan il-punt ta' tmiem waħdu għandhom jiġu ttrattati bil-galbu. Hemm disponibbli metodi differenti sabiex tiġi vvalutata l-produzzjoni tal-VTG fl-ispeċijiet tal-ħut ikkunsidrati f'dan l-assaġġ. Teknika ta' kejl li hija kemm relattivament sensittiva u speċifika hija d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-proteini permezz tal-assaġġ tal-immunosorbenti marbutin mal-enżimi (ELISA). Għandhom jintużaw antikorpi omologi (imrobbijin kontra l-VTG tal-istess speċijiet) u l-iktar standards importanti tal-omologi.

Determinazzjoni tas-sess

52. Skont il-proċedura ta' kampjunar tal-VTG, ħut sħiħ jew is-sezzjoni tan-nofs li jifdal ta' kull ħuta jitqiegħdu f'kaxxetta ta' pproċessar ittikkettata minn qabel u jiġu ffissati f'fissattiv xieraq għad-determinazzjoni istoloġika tas-sess (dan jista' jsir ukoll għall-evalwazzjoni tas-sejbien tal-istadju tal-gonadi). Gwida dwar l-iffissar u l-inkorporazzjoni hija pprovduta fl-Appendiċi 7 kif ukoll fl-"OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads" (22). Wara l-ipproċessar, il-ħut jiġi inkorporat fi blokok tal-paraffina. L-individwi għandhom jitqiegħdu b'mod lonġitudinali fil-blokka tal-paraffina. Minn kull individwu jittieħdu minimu ta' sitt sezzjonijiet lonġitudinali (ħxuna ta' 3-5 μm) fi pjan frontali inkluż tessut gonadali miż-żewġ gonadi. L-intervall bejn dawn is-sezzjonijiet għandu jkun ta' madwar 50 μm għall-irġiel u 250 μm għan-nisa. Madankollu, peress li spiss kull blokka ser ikun fiha rġiel u nisa (jekk iktar minn individwu wieħed jiġi inkorporat f'kull blokka), l-intervall ta' bejn is-sezzjonijiet minn dawn il-blokok għandu jkun ta' madwar 50 μm sakem jinkisbu tal-inqas sitt sezzjonijiet tal-gonadi minn kull raġel. Wara, l-intervall bejn is-sezzjonijiet jista' jiżdided għal madwar 250 μm għan-nisa. Is-sezzjonijiet jittebbgħu b'ematossilina u eożina u jiġu eżaminati b'mikroskopju ħafif b'enfasi fuq is-sess (irġiel, nisa, intersess jew mhux differenzjati). L-interess huwa ddefinit bħala preżenza ta' iktar minn ooċita waħda f'testikolu għal kull sitt sezzjonijiet analizzati jew ċelloli spermatoġeniċi (iva/le) fl-ovarji. L-istopatoloġija u s-sejbien tal-istadju tal-ovarji u t-testikoli mhumiex obbligatorji iżda jekk jiġu investigati, ir-riżultati għandhom jiġu analizzati statistikament u rrapportati. Ta' min jinnota li fin-natura tagħhom ċerti speċijiet tal-ħut ma għandhomx par żviluppat ta' gonadi u jista' jkun hemm gonada waħda (eż. il-medaka Ġappuniża u kultant iż-żebra). Dawn l-osservazzjonijiet kollha għandhom jiġu rreġistrati.

53. Id-determinazzjoni tas-sess ġenetiku f'medaka Ġappuniża individwali hija bbażata fuq il-preżenza jew l-assenza tal-ġene ta' determinazzjoni tas-sess maskili tal-medaka, id-DMY, li jinsab fuq il-kromożoma Y. Is-sess ġenotipiku tal-medaka jista' jiġi identifikat b'sekwenzjar tal-ġene DMY mid-DNA

▼M6

estratt minn, pereżempju, biċċa pinna anali jew dorsali. Il-preżenza tad-DMY tindika individwu (raġel) XY indipendentement mill-fenotip, filwaqt li n-nuqqas ta' DMY jindika individwu XX (mara) indipendentement mill-fenotip (23). Fl-Appendiċi 9 tingħata gwida għat-tħejjija tat-tessuti u l-metodu tal-PCR. Id-determinazzjoni tas-sess ġenetiku fl-ispinarell issir bil-metodu ta' PCR ukoll, deskritt fl-Appendiċi 10.

54. L-okkorrenza ta' interess (għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 1) għandha tiġi rrapportata.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

55. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji huma taħt kontroll endokrinali fi speċijiet bħall-medaka Ġappuniża; għaldaqstant, l-osservazzjonijiet tad-dehra fiżika tal-ħut għandhom isiru fi tmiem l-espożizzjoni, jekk dan ikun possibbli. Fil-medaka Ġappuniża, il-formazzjoni papillari fuq il-parti ta' wara tal-pinna anali fin-nisa hija sensittiva għall-androġeni. Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness (38) jipprovdi ritratti relevanti tal-karatteristiċi sesswali sekondarji tal-irġiel u n-nisa androġenizzati.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

56. Importanti li l-iktar test statistiku validu b'saħħtu jistabbilixxi l-punt ta' tmiem. L-irreplikat huwa l-unità sperimentali iżda l-varjabbiltà intrarreplikati għandha tkun inkluża fl-ittestjar statistiku. Flow-chart tad-deċiżjonijiet hija disponibbli fl-Appendiċi 8 biex tgħin fl-iktar test statistiku xieraq li għandu jintuża fuq il-bażi tal-karatteristika tad-dejta miksuba mit-test. Il-livell ta' importanza statistika huwa ta' 0,05 għall-punti ta' tmiem kollha inklużi.

Proporzjonijiet tas-sess u s-sess ġenetiku.

57. Il-proporzjonijiet tas-sess għandhom jiġu analizzati għal effett sinifikanti (approċċ tal-NOEC/LOEC) tal-espożizzjoni b'(test tax-xejriet) Jonckheere-Terpstra jekk jeżisti doża-rispons monotonu. Jekk tinstab nonmonotoniċità, f'dak il-każ għandu jiġi applikat pair wise test: Uża t-test ta' Dunnett jekk jistgħu jinkisbu normalità u varjanza omoġena. Uża Tamhane-Dunnett jekk tkun preżenti varjanza eteroġena. Inkella uża test eżatt ta' Mann-Whitney b'aġġustament ta' Bonferroni-Holm. Fl-Appendiċi 8 hemm flow chart li tiddeskrivi l-istatistiki tal-proporzjonijiet tas-sess. Il-proporzjonijiet tas-sess għandhom jiġu ppreżentati f'tabelli bħala proporzjonijiet tal-konċentrazzjoni ± SD ta' rġiel, nisa, interess u mhux differenzjati. Għandu jinxteħet dawl fuq is-sinifikat statistika. L-eżempji huma ppreżentati fir-rapport ta' validazzjoni tal-Faži 2 tal-FSDT (42). Is-sess ġenetiku għandu jiġi rrapportat bħala perċentwal tal-bidla lura tas-sess fenotipiku ta' rġiel, nisa, intersess u mhux differenzjati.

Konċentrazzjonijiet tal-VTG

58. Il-konċentrazzjonijiet tal-VTG għandhom jiġu analizzati għal effett sinifikanti (approċċ tal-NOEC/LOEC) tal-espożizzjoni. It-test ta' Dunnett huwa ppreferut iktar mit-test-t bil-korrezzjoni ta' Bonferroni. Meta tintuża korrezzjoni Bonferroni, aħjar tintuża l-korrezzjoni ta' Bonferroni-Holm. Għandu jiġi pprovdut għal log-trasformazzjoni tal-VTG sabiex jinkisbu normalità u omoġenità tal-varjanza. Imbagħad, jekk il-konċentrazzjoni-rispons ikun konsistenti ma' monotoniċità, f'dak il-każ aħjar jintuża t-test ta' Jonckheere-Terpstra u mhux dawk imsemmijin iktar 'il fuq. Jekk jintużaw it-testijiet-t jew it-test ta' Dunnett, ma hemmx bżonn ta' test-F ANOVA ta' sinifikanza biex wieħed jipproċedi. Għad-dettalji, ara l-flow-chart fl-Appendiċi 8. Ir-riżultati għandhom jiġu rrapportati f'tabelli bħala medji tal-konċentrazzjoni

▼M6

± SD għal irġiel, nisa, intersess u mhux differenzjati b'mod separat. Għandu jinxteħet dawl fuq is-sinifikanza statistika għal nisa fenotipiċi u rġiel fenotipiċi. L-eżempji huma ppreżentati fir-rapport ta' validazzjoni tal-Fażi 2 tal-FSDT (42).

Konċentrazzjonijiet propji tas-sustanza kimika tat-test

59. Il-konċentrazzjonijiet propji tal-kompartiment tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu analizzati fil-frekwenzi deskritti fil-paragrafu 34. Ir-riżultati għandhom jiġu rrapportati f'tabelli bħala konċentrazzjoni medja ± SD fuq bażi tal-irreplikati kif ukoll fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni b'enfasi fuq l-informazzjoni dwar in-numru ta' kampjuni u b'outliers mill-konċentrazzjoni medja tat-trattament ± 20 %. L-eżempji jistgħu jinkisbu mir-rapport ta' validazzjoni tal-Fażi 2 tal-FSDT (42).

Interpretazzjoni tar-riżultati

60. Ir-riżultati tat-test għandhom jiġu interpretati bil-galbu meta l-konċentrazzjonijiet imkejlin tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjonijiet tat-test iseħħu f'livelli qrib il-limitu ta' identifikazzjoni tal-metodu analitiku.

Rapport tat-test

61. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test

— Il-karatteristiċi fiżikokimiċi relevanti; identifikazzjoni tas-sustanza kimika, dejta li tinkludi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

— Il-proċedura tat-test użata (eż. tiġdid/semistatiku bi fluss kontinwu); id-disinn tat-test għandu jinkludi konċentrazzjonijiet tat-test, il-metodu ta' tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin (f'Anness), il-frekwenza tat-tiġdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejlin u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fil-kompartimenti tat-test u l-metodu li bih inkisbu (il-metodu analitiku użat għandu jiġi ppreżentat f'Anness);Evidenza li l-kejliet jirreferu għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;

— Il-kwalità tal-ilma fi ħdan il-kompartimenti tat-test: il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt;

— Informazzjoni ddettaljata dwar it-tmigħ (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza u l-analiżijiet għall-kontaminanti (eż. il-PCBs, il-PAHs u l-pestiċidi organokloru) jekk relevanti.

Riżultati

— Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji dwar il-validità: dejta dwar ir-rata ta' tifqis għandha tiġi ppreżentata f'tabelli bħala perċentwal għal kull irreplikat u għal kull konċentrazzjoni. L-outliers mill-kriterji ta' aċċettazzjoni (fil-kontrolli) għandhom jiġu enfasizzati. Is-sopravivenza għandha tiġi ppreżentata bħala perċentwal għal kull irreplikat u għal kull konċentrazzjoni. L-outliers mill-kriterji tal-validità (fil-kontrolli) għandhom jiġu enfasizzati;

— Indikazzjoni ċara tar-riżultati miksubin fuq il-punti ta' tmiem differenti osservati: sopravivenza u tifqis b'suċċess tal-embrijuni; anormalitajiet esterni; tul u piż; kejliet tal-VTG (ng/g omoġenat, ng/ml plażma jew

▼**M6**

ng/mg fwied); istoloġija tal-gonadi, proporzjon tas-sessi, dejta dwar is-sess ġenetiku; inċidenza ta' kwalunkwe reazzjoni mhux tas-soltu mill-ħut u kwalunkwe effett viżibbli prodott mis-sustanza kimika tat-test.

62. Ir-riżultati għandhom jiġu ppreżentati bħala valur medji ± devjazzjoni standard (SD) jew żball standard (SE). L-istatistiki għandhom jiġu rrapportati tal-inqas bħala NOEC u LOEC u intervalli ta' kunfidenza. Għandha tiġi segwita l-flow-chart statistika (Appendiċi 8).

LETTERATURA

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, "Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", Environmental Health Perspectives 103, pp. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), "An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), "Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), "Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters", Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", Aquatic Toxicology 65, pp. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), "Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), "Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), "Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)", Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), "Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), "The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), "Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology", 78, pp. 202-206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), "Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), "Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), "Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3, pp. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), "An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio", Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088-1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), "Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes", Developmental Dynamics 231, pp. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), "Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations", Zoological Science 21, pp. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), "Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake", Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), "Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), "Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), "Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)", Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), "Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), "Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)", Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), "Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development", Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), "Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

(34) Il-Kapitolu C.14 ta' dan l-Anness, Test tat-Tkabbir tal-Ħut Żgħir.

(35) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, Bijodegradabilità Lesta.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(38) Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Ħut ta' 21 Jum: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), "Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio" Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/-MONO(2011)22, OECD, Paris.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/-MONO(2011)23, OECD, Paris.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/-MONO(2011)24, OECD, Paris.

(44) Id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi. ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33.

▼**M6**

Appendiċi 1

Abbrevjazzjonijiet u definizzjonijiet

Punt ta' tmiem apikali: Li jikkaġuna effett fil-livell tal-popolazzjoni

ASV: Valur ta' saturazzjoni tal-arja

Bijomarkatur: Li jikkaġuna effett fil-livell individwali

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Dph: Jiem wara t-tifqis

DMY: Ġene tad-dominju DM speċifiku għall-Y meħtieġ għall-iżvilupp tal-irġiel fil-ħut medaka

ELISA: Assaġġ tal-Immunosorbent Marbut mal-Enżimi

Piż tal-ħut: Piż imxarrab tal-ħut (imnixxef bit-taptip)

FSDT: Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut

Assi tal-HPG: Assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali

Hut intersess: Ħut b'iktar minn ooċita waħda fit-testikoli għal kull 6 sezzjonijiet analizzati jew ċelloli spermatoġeniċi fl-ovarji (iva/le)

Rata tat-tagħbija: Piż imxarrab tal-ħut għal kull volum ta' ilma

MOA: Modalità ta' azzjoni

RT-PCR: Reazzjoni Katina tal-Polimeraży tat-Transkriptaży Rigressiva

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata li tuża dan il-metodu ta' ttestjar.

Hut mhux differenzjat: Ħut b'gonadi li ma jesibixxu ebda ċellula ġerminali dixxernibbli.

VTG: Vitelloġenina

▼**M6**

Appendiċi 2

Kundizzjonijiet sperimentali għall-FSDT (speċijiet tal-ilma ħelu)

1. Speċijiet irrakkomandati	Medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*)	Żebra (*Danio rerio*)	Spinarell (*Gasterosteus aculeatus*)
2. Tip tat-test	Bi fluss kontinwu jew semistatiku	Bi fluss kontinwu jew semistatiku	Bi fluss kontinwu jew semistatiku
3. Temperatura tal-ilma	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa'
5. Intensità tad-dawl	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)
6. Fotoperjodu	12-16-il siegħa dawl, 8-12-il siegħa dlam	12-16-il siegħa dawl, 8-12-il siegħa dlam	16-il siegħa dawl, 8 sigħat dlam
7. Daqs minimu tal-kompartiment	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l
8. Skambji tal-volumi tas-soluzzjonijiet tat-test	Tal-inqas 5 kuljum	Tal-inqas 5 kuljum	Tal-inqas 5 kuljum
9. Età tal-organiżmi tat-test fil-bidu tal-espożizzjoni	Bajd iffertilizzat ġdid (Stadju bikri tal-blastula)	Bajd iffertilizzat ġdid (Stadju bikri tal-blastula)	Bajd iffertilizzat ġdid
10. Nru ta' bajd għal kull trattament	Tal-inqas 120	Tal-inqas 120	Tal-inqas 120
11. Nru ta' trattamenti	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)
12. Nru ta' rreplikati għal kull trattament	Tal-inqas 4 (ħlief f'każ ta' allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)	Tal-inqas 4 (ħlief f'każ ta' allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)	Tal-inqas 4 (ħlief f'każ ta' allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)
13. Reġim tat-tmigħ	*Artemia* ħajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmigħ darbtejn kuljum	Ikel speċjali għall-ħut żgħir, *Artemia* ħajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmigħ darbtejn kuljum	*Artemia* ħajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmigħ darbtejn kuljum
14. Għoti tal-arja	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 60 %	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 60 %	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 70 %

▼**M6**

15. Ilma ta' dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif
16. Durata tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test	60-dph	60-dph	60-dph
17. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	Suċċess tat-tifqis, morfoloġija Gross tas-Sopravivenza, VTG istoloġija tal-gonadi, Sess ġenetiku Proporzjon tas-sessi	Suċċess tat-tifqis, Sopravivenza Morfoloġija gross, VTG istoloġija tal-gonadi, Proporzjon tas-sessi	Suċċess tat-tifqis, Sopravivenza Morfoloġija gross, VTG istoloġija tal-gonadi, Proporzjon tas-sessi
18. Kriterji tal-aċċettabilità tat-test għall-irreplikati kollettivi tal-kontrolli	Suċċess tat-tifqis > 80 %	Suċċess tat-tifqis > 80 %	Suċċess tat-tifqis > 80 %
	Sopravivenza wara t-tifqis ≥ 70 % tkabbir	Sopravivenza wara t-tifqis ≥ 70 % tkabbir	Sopravivenza wara t-tifqis ≥ 70 % tkabbir
	(Piż imxarrab tal-ħut, imnixxef bit-taptip) > 150 mg	(Piż imxarrab tal-ħut, imnixxef bit-taptip) > 75 mg	(Piż imxarrab tal-ħut, imnixxef bit-taptip) > 120 mg
	Tul (tul standard) > 20 mm	Tul (tul standard) > 14 mm	Tul (tul standard) > 20 mm
	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70 %	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70 %

▼**M6**

Appendiċi 3

Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli

KOSTITWENT	KONĊETRAZZJONI
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg /l
Kloru residwu	< 10 µg /l
Pestiċidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

▼**M6**

Appendiċi 4

Mill-metodu ta' ttestjar C.14 /gwida dwar il-konċentrazzjonijiet tat-test

Kolonna (Numru ta' konċentrazzjonijiet bejn 100 u 10 jew bejn 10 u 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Minn kolonna tista' tingħażel sensiela ta' tliet konċentrazzjonijiet suċċessivi (jew iktar). Il-punti tan-nofs bejn il-konċentrazzjonijiet fil-kolonna (x) jinsabu fil-kolonna (2x + 1). Il-valuri elenkati jistgħu jirrappreżentaw konċentrazzjonijiet mogħtijin bħala perċentwal għal kull volum jew piż (mg/l jew µg/l). Il-valuri jistgħu jiġu mmoltiplikati jew jiġu diviżi bi kwalunkwe power ta' 10 kif xieraq. Tista' tintuża l-kolonna 1 jekk kien hemm inċertezza konsiderevoli fuq il-livell tat-tossiċità.

▼**M6**

Appendiċi 5

Gwida għall-omoġenizzazzjoni tar-ras u d-denb minn żebra, karpjun buras, spinarell u medaka ġappuniża żgħar

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddeskrivi l-proċeduri li jseħħu qabel ma tiġi kkwantifikata l-konċentrazzjoni tal-VTG. Jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jirriżultaw fi kwantifikazzjoni paragunabbli tal-VTG. Tista' tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tad-demm jew il-fwied minflok l-omoġenat tar-ras/tad-denb.

Proċedura

1. Il-ħut huwa anestetizzat u ewtanizzat skont id-deskrizzjoni tat-test.

2. Ir-ras u d-denb jinqatgħu skont id-deskrizzjoni tat-test. **Importanti**: L-istrumenti kollha ta' dissezzjoni, u l-injama tal-qtugħ għandhom jitlaħalħu u jitnaddfu sew (eż. b'etanol 96 %) bejn it-tqandil ta' kull ħuta individwali sabiex jiġi evitat "tniġġis tal-VTG" minn nisa jew irġiel indotti għal irġiel mhux indotti.

3. Il-piż tar-ras u d-denb kollettivi minn kull ħuta jitkejjel sal-eqreb mg.

4. Wara li jintiżnu, il-partijiet jitqiegħdu f'tubi xierqa (eż. eppendorf 1,5 ml) u jiġu ffriżati f'– 80 °C sal-omoġenizzazzjoni jew jiġu omoġenizzati direttament fuq is-silġ b'żewġ pistils tal-plastik. (Jistgħu jintużaw metodi oħrajn jekk isiru fuq is-silġ u r-riżultat ikun massa omoġena). **Importanti**: *It-tubi għandu jkollhom in-numru xieraq sabiex ir-ras u d-denb mill-ħuta jkunu jistgħu jiġu rrelatati mas-sezzjoni tal-ġisem rispettiva tagħhom użata għall-istoloġija tal-gonadi*.

5. Meta tinkiseb massa omoġena jiżdied ammont ta' 4-10 darbiet il-piż tat-tessut ta' **bafer ta' omoġenizzazzjoni** (*) kiesaħ silġ (ħu nota tad-dilwizzjoni). Ibqa' aħdem bil-pistils sakemm it-taħlita tiġi omoġena. **Nota importanti**: *Għal kull ħuta jintużaw pistils ġodda*.

6. Il-kampjuni jitqiegħdu fis-silġ saċ-ċentrifugazzjoni f'**4 °C** f'50 000 g għal 30 min.

7. Uża pipetta biex tiddistribwixxi porzjonijiet ta' 20 sa 50 µl (ħu nota tal-ammont) supernatant f'**tal-inqas żewġ** tubi billi tbill il-ponta tal-pipetta taħt is-saff ta' xaħam tal-wiċċ u billi tiġbed bil-galbu s-supernatant mingħajr xaħam- jew frazzjonijiet ta' gerbub.

8. It-tubi jinħażnu f'– 80 °C sakemm jintużaw.

(*) *Bafer ta' omoġenizzazzjoni*
50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Taħlita tal-inibitur tal-proteażi (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Taħlita tal-inibitur tal-proteażi (jew taħlitiet tal-inibitur tal-proteażi ekwivalenti).
TRIS: TRIS-ULTRA PUR (ICN)
Taħlita tal-inibitur tal-proteażi: Mis-Sigma (għal tessut tal-mammiferi) Numru tal-prodott **P 8340**.

Nota:Il-bafer ta' omoġenizzazzjoni għandu jintuża dakinhar tal-manifattura tiegħu. Qiegħdu fuq is-silġ matul l-użu

▼**M6**

Appendiċi 6

Gwida għall-kwantifikazzjoni tal-vitelloġenina tal-omoġenat tar-ras u d-denb fiż-żebra (Danio rerio) (immodifikata minn Holbech et al., 2001). jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jużaw standards u antikorpi omologi

1. Il-platti tal-mikrotiter (Maxisorp F96 iċċertifikat, Nunc, Roskilde id-Danimarka) miksijin minn qabel b'5 µg/ml lipovitellina-IgG antiżebra jitħallew joqogħdu u jinħaslu tliet darbiet b'bafer tal-ħasil (*).

2. Il-vitelloġenina ppurifikata standard taż-żebra ([1]) tiġi dilwita b'mod serjali għal 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 u 20 ng/ml f'bafer ta' dilwizzjoni (**) u l-kampjuni jiġu dilwiti tal-inqas 200 darba (sabiex jiġi evitat effett matriċi) f'bafer ta' dilwizzjoni u tiġi applikata għall-platti. Jiġi applikat kontroll tal-assaġġ f'duplikat. Jiġu applikati 150 µl f'kull toqba. L-istandards huma applikati fid-duplikat u l-kampjuni fi triplikat. Inkubahom tul il-lejl f'4 °C fuq xejker.

3. Il-platti jinħaslu 5 darbiet b'bafer tal-ħasil (*)

4. HRP akkoppjata ma' katina dextran (eż. AMDEX A/S, id-Danimarka) u antikorpi kkonjugati huma dilwiti f'bafer tal-ħasil; Id-dilwizzjoni propja tvarja skont il-lott u l-età. Jiġu applikati 150 µl għal kull toqba u l-platti jiġu inkubati għal siegħa f'temperatura tal-kamra fuq xejker.

5. Il-platti jinħaslu 5 darbiet b'bafer tal-ħasil u qiegħ il-platti jitnaddaf bil-galbu bl-etanol.

6. F'kull toqba jiġu applikati 150 µl TMB plus (***). Ipproteġi l-platt kontra d-dawl b'fojl tal-landa, u ara l-iżvilupp tal-kulur fuq xejker.

7. Meta l-kurva standard tiġi żviluppata bis-sħiħ, l-attività tal-enżima titwaqqaf billi jiżdiedu 150 µl 0,2 M H_2SO_4 f'kull toqba.

8. L-assorbenza titkejjel b'450 nm (eż. fuq Molecular Devices Thermomax plate reader). Id-dejta tiġi analizzata fuq is-software assoċjat (eż. Softmax).

(*) Bafer tal-ħasil:

PBS-stock (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Aġġusta l-pH għal 7,3 u imla sa 5 l b'H_2O millipori. Aħżen f'4 °C.

(**) Bafer ta' dilwizzjoni:

PBS-Stock (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Aġġusta l-pH għal 7,3 u imla sa 1 l b'H_2O millipori. Aħżen f'4 °C.

(***) TMB plus huwa substrat “lest biex tużah” immanifatturat minn KemEnTec (id-Danimarka). Huwa sensittiv għad-dawl. Aħżen f'4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1.18 mg/ml (AAA)), ippurifikat skont: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

▼**M6**

(****) PBS stock

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Aġġusta l-pH għal 6,8 u imla sa 2 l b'H_2O millipori. Aħżen f'temperatura tal-kamra.

▼M6

Appendiċi 7

Gwida għat-tħejjija tas-sezzjonijiet tat-tessut għad-determinazzjoni tas-sessi u s-sejbien tal-istadju tal-gonadi

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddeskrivi l-proċeduri li jseħħu qabel l-evalwazzjoni tas-sezzjonijiet istoloġiċi. Jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jirriżultaw f'determinazzjoni tas-sessi u sejbien tal-istadji tal-gonadi li huma simili.

Bi ftit eċċezzjonijiet, dawn il-proċeduri huma simili għal medaka Ġappuniża (JMD) u żebra (ZF).

Ewtanażja, Nekropsija, u Fissazzjoni tat-Tessuti

Objettivi:

1. Jiġi pprovdut għas-sagrifiċċju dinjituż tal-ħut.

2. Il-kisba tal-piżijiet u l-kejliet meħtieġa.

3. Evalwazzjoni ta' karatteristiċi sekondarji tas-sessi.

4. Dissezzjoni tat-tessuti għal analiżi tal-VTG.

5. Fissazzjoni tal-gonadi.

Proċeduri:

1. Il-ħut għandu jiġi ssagrifikat eżatt qabel in-nekropsija. Għalhekk, sakemm ma jkunx hemm bosta prosetturi disponibbli, ma għandhomx jiġu ssagrifikati diversi ħutiet fl-istess ħin.

2. Bl-użu ta' xibka b'manku żgħir, ħuta titneħħa mill-kompartiment sperimentali u tittieħed fiż-żona tan-nekropsija fil-kontenitur tat-trasport.

3. Il-ħut jitqiegħed fis-soluzzjoni tal-ewtanażja. Il-ħut jitneħħa mis-soluzzjoni meta jieqaf jieħu nifs u ma jibqax risponsiv għal stimoli esterni.

4. Jittieħed il-piż imxarrab tal-ħut.

5. Għat-tħejjija tat-tessuti għal analiżi tal-VTG, il-ħut jista' jitqieħed fuq bord tas-sufra fuq il-pjanċa ta' mikroskopju ta' dissezzjoni.

   a. Għaż-żebra, ir-ras tinqata' eżatt wara l-pinna pettorali u d-denb jinqata' eżatt wara l-pinna dorsali.

   b. Għal medaka Ġappuniża, l-addome jinfetaħ permezz ta' qatgħa magħmula bil-galbu li testendi tul il-linja tan-nofs ventrali miċ-ċintura pettorali sa punt kranjali sal-anus. Bl-użu ta' forċipi żgħar u mqass żgħir, jitneħħa bil-galbu l-fwied.

6. Il-kampjuni għall-analiżi tal-VTG jitqiegħed f'tubi eppendorf u jiġu ffriżati minnufih f'nitroġenu likwidu.

7. Il-karkassi inklużi l-gonadi jitqiegħdu f'kaxxetta tat-tessuti tal-plastik immarkata minn qabel, li mbagħad tiġi ttrasferita f'fissattiv ta' Davidson jew Bouin. Il-volum tal-fissattiv għandu jkun tal-inqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. Il-kontenitur tal-fissattiv jitħawwad bil-galbu għal ħames sekondi sabiex jinqalgħu l-bżieżaq tal-arja mill-kaxxetta.

8. a. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson tul il-lejl kollu, u mbagħad l-għada jiġu ttrasferiti f'kontenituri individwali ta' formalina bbaferjata newtrali ta' 10 %. Il-kontenituri bil-kaxxetti jitħalltu bil-galbu għal 5 sekondi sabiex tiġi żgurata penetrazzjoni adegwata tal-formalina fil-kaxxetti.

▼M6

b. It-tessuti jibqgħu f'fissattiv ta' Bouin għal 24 siegħa, u mbagħad jiġu ttrasferiti f'etanol ta' 70 %.

Ipproċessar tat-Tessuti

Objettivi:

1. Tessut deidratat għal penetrazzjoni adegwata tal-paraffina.

2. Introduċi l-paraffina fit-tessut sabiex tinżamm l-integrità tat-tessut u jinħoloq wiċċ sod għal mikrotomija.

Proċeduri:

3. Il-kaxxetti tat-tessut immarkati jitneħħew mill-formalina/ħżin tal-etanol u l-kaxxetti jitqiegħdu fil-basket/basktijiet tal-ipproċessar. Il-basket tal-ipproċessar jiġi kkargat fil-proċessur tat-tessuti.

4. Tingħażel l-iskeda tal-ipproċessar.

5. Meta l-proċessur tat-tessuti jlesti ċ-ċiklu ta' pproċessar, il-basket/basktijiet jista' jiġi ttrasferit fl-istazzjon inkorporata.

Inkorporazzjoni

Objettiv:

Orjenta l-kampjun kif xieraq f'paraffina ssolidifikata għal mikrotomija.

Proċeduri:

1. Il-basket/basktijiet tal-kaxxetti jitneħħa mill-proċessur u jitgħaddas fil-kompartiment ta' quddiem mimli paraffina tal-konsol termali tal-istazzjon ta' inkorporazzjoni jew inkella l-kaxxetti jitqiegħdu f'ħiter tal-paraffina separat.

2. L-ewwel kaxxetta li trid tiġi inkorporata mill-kompartiment ta' quddiem tal-konsol termali jew il-ħiter tal-paraffina. L-għatu tal-kaxxetta jitneħħa u jintrema, u t-tikketta tal-kaxxetta tiġi kkontrollata mar-rekords tal-annimali biex jiġu solvuti diskrepanzi potenzjali qabel l-inkorporazzjoni.

3. Tingħażel kaxxa tat-tiswir ta' inkorporazzjoni b'daqs xieraq.

4. Il-kaxxa tat-tiswir tinżamm taħt iż-żennuna tal-konsol tad-distribuzzjoni u timtela' b'paraffina mdewba.

5. Il-kampjun jitneħħa mill-kaxxetta u jitqiegħed fil-paraffina mdewba fil-kaxxa tat-tiswir. Dan jiġi rripetut b'4-8 kampjuni għal kull kaxxa tat-tiswir tal-paraffina. Il-pożizzjoni tal-ħut individwali tiġi mmarkata billi l-ħuta nru 1 titqieħed f'180 grad mill-ħuta 2-4/8.

6. Hija meħtieġa paraffina addizzjonali biex ikun kopert il-kampjun.

7. Il-kaxxa tat-tiswir bil-bażi tal-kaxxetta titqiegħed fuq il-platt tat-tkessiħ tal-kriokonsol.

8. Wara li tissolidifika l-paraffina, il-blokka (jiġifieri l-paraffina mwebbsa li fiha t-tessuti u l-bażi tal-kaxxetta) titneħħa mill-kaxxa tat-tiswir.

Mikrotomija

Objettiv:

Aqta' u tella' s-sezzjonijiet istoloġiċi għat-tilwin.

Proċeduri:

1. Il-fażi inizjali tal-mikrotomija msejħa "facing" issir kif ġej:

   a. Il-blokka tal-paraffina titqiegħed fiċ-ċokk tal-mikrotoma.

   b. Iċ-ċokk jitmexxa billi tiddawwar ir-rota tal-mikrotoma u s-sezzjonijiet ħoxnin jinqatgħu mill-wiċċ tal-paraffina tal-blokka sakemm is-sikkina tilħaq it-tessuti inkorporati.

▼M6

c. Il-ħxuna tas-sezzjoni fuq il-mikrotoma hija stabbilita għal bejn 3 — 5 mikroni. Iċ-ċokk jitmexxa u jinqatgħu bosta sezzjonijiet mill-blokka sabiex jitneħħa kwalunkwe oġġett maħluq fuq wiċċ il-qatgħa tat-tessut matul il-qtugħ ta' fuq fuq.

d. Il-blokka tista' titneħħa miċ-ċokk u titqiegħed wiċċha 'l isfel fuq is-silġ biex tassorbi t-tessut.

2. Il-fażi li jmiss tal-mikrotoma hija s-sezzjonar finali u t-tlugħ tas-sezzjonijiet tat-tessut fuq is-slides. Dawn il-proċeduri jsiru kif ġej:

a. Jekk il-blokka tqiegħdet fuq is-silġ, il-blokka titneħħa mis-silġ u tiġi sostitwita fiċ-ċokk tal-mikrotoma.

b. Bil-ħxuna tas-sezzjoni fuq il-mikrotoma stabbilita għal 3 — 5 mikroni, iċ-ċokk jitmexxa bit-tidwir tar-rota tal-mikrotoma. Is-sezzjonijiet jinqatgħu mill-blokka sakemm tiġi prodotta "żigarella" waħda li jkun fiha tal-inqas sezzjoni aċċettabbli waħda inkluża l-gonadi. (Skont kif ikun il-bżonn matul is-sezzjonar, il-blokka tista' titneħħa miċ-ċokk, titqiegħed fuq is-silġ biex tixrob it-tessut, u tiġi sostitwita fiċ-ċokk.)

c. Is-sezzjonijiet jiġu ggalleġġati ċatti fuq wiċċ l-ilma fil-banju tal-ilma. Isir tentattiv biex tal-inqas tinkiseb sezzjoni waħda li ma jkun fiha ebda tikmix u ma jkollha ebda bżieżaq tal-arja maqbudin taħtha.

d. Slide tal-mikroskopju titgħaddas taħt l-aħjar sezzjoni, li tinħareġ mill-ilma bl-użu tas-slide. Dan il-proċess jissejjaħ "tlugħ" tas-sezzjoni fuq is-slide.

e. It-tliet sezzjonijiet jitħejjew għal sett ħut. It-tieni u t-tielet sezzjonijiet jittieħdu f'intervalli ta' 50 mikron wara l-ewwel sezzjoni. Jekk il-ħut ma jiġix inkorporat bil-gonadi tiegħu fl-istess livell ta' sezzjonar, iridu jsiru iktar sezzjonijiet sabiex jiġi żgurat li jinkisbu tal-inqas sitt sezzjonijiet inklużi l-gonadi minn kull ħuta.

f. B'pinna li timmarka s-slides, fuq is-slide jitħażżeż in-numru tal-blokka li minnu ġiet prodotta s-slide.

g. Is-slide titqiegħed f'reċipjent tat-tilwin.

h. Il-blokka titneħħa miċ-ċokk u titqiegħed wiċċha 'l isfel għall-ħżin.

Tilwin, Vetrina għatu, u Tikkettar tas-Slides

Objettivi:

— Ċappas is-sezzjonijiet għal eżaminazzjoni istopatoloġika

— Issiġilla b'mod permanenti t-tessuti mtellgħin u mlewna.

— Identifika b'mod permanenti s-sezzjonijiet imlewnin b'mod li jippermetti traċ-ċabbiltà sħiħa.

Proċeduri:

1. Tilwin

a. Is-slides jitnixxfu bl-arja tul il-lejl qabel jitlewnu.

b. Is-sezzjonijiet jiċċappsu b'Ematossilina-Eosina.

2. Vetrina għatu

a. Il-vetrini għatu jistgħu jiġu applikati b'mod manwali jew awtomatiku.

b. Slide titgħaddas fil-ksilen jew TissueClear, u l-ksilen/TissueClear żejjed jitneħħa b'taptip ħafif mill-ġenb.

▼**M6**

c. Jiġi applikat madwar 0,1 ml tal-midjum tat-tlugħ qrib tmiem is-slide faċċata t-tarf finali kiesaħ jew fuq il-vetrina għatu.

d. Il-vetrina għatu tiddawwar f'angolu baxx u tiġi applikata fuq is-slide.

3. Tikkettar

e. Kull tikketta tas-slide għandu jkun fiha l-informazzjoni li ġejja.

i. Isem il-laboratorju

ii. L-ispeċijiet

iii. Nru tal-Kampjun / Nru tas-Slide

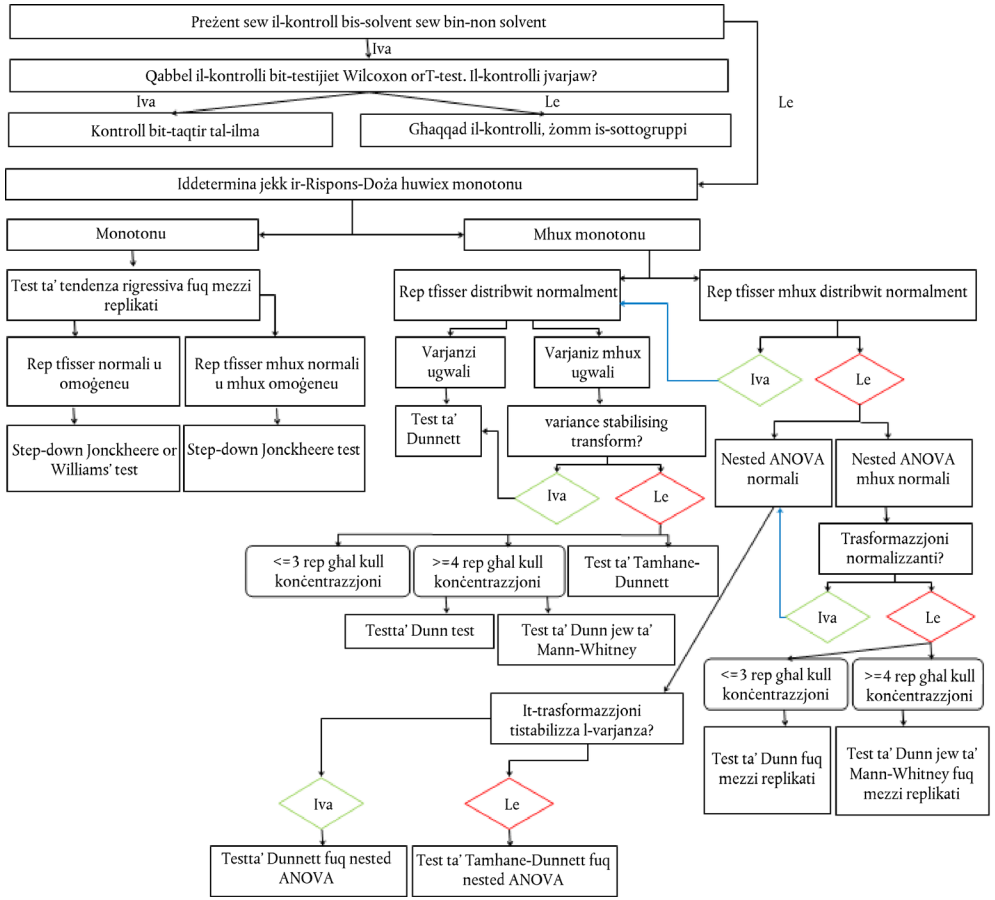
iv. Grupp tat-trattament / Sustanza Kimika

v. Data

▼M6

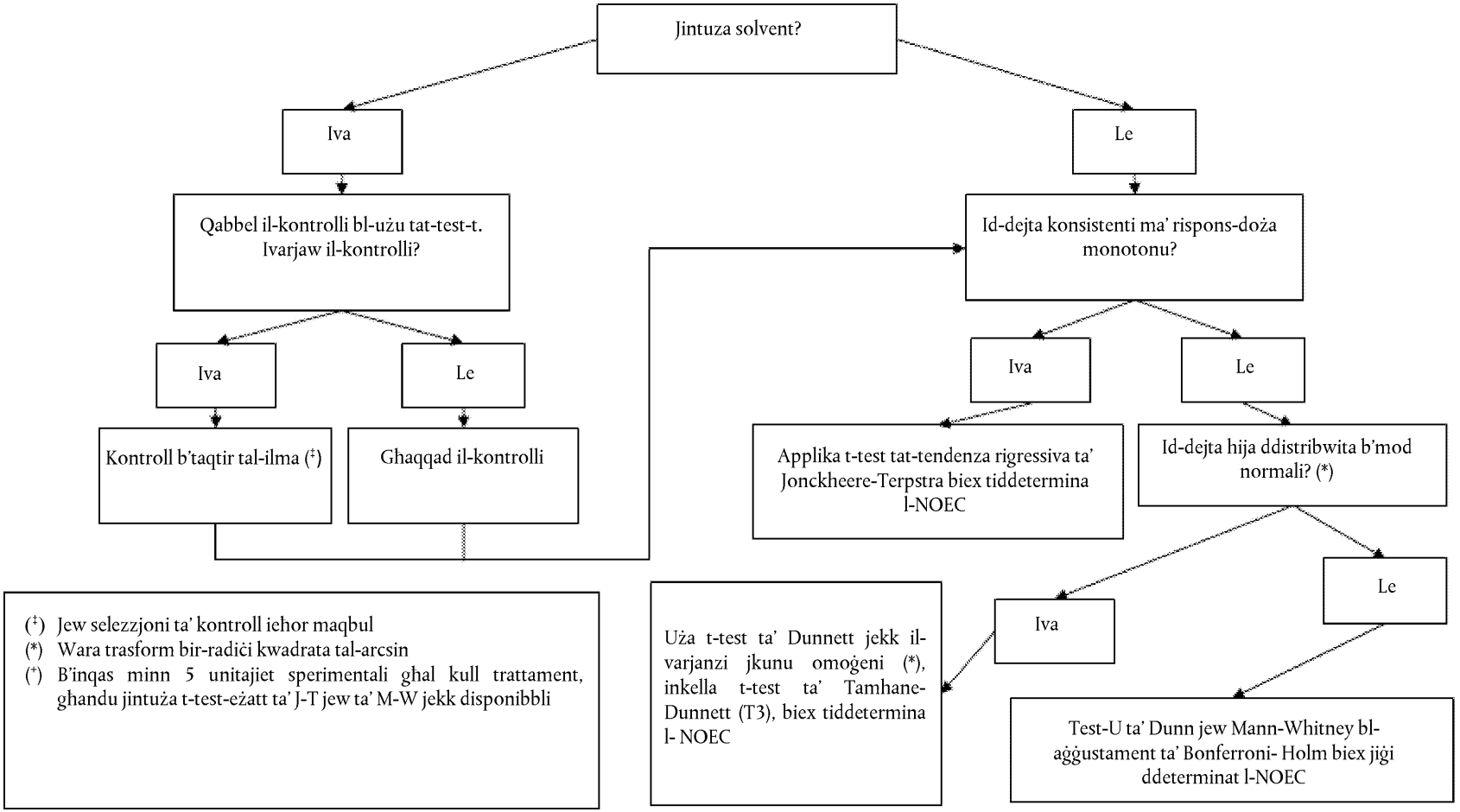
Appendiċi 8

Flow Chart Statistika għal analiżi tal-vitelloġenina



▼M6

Flow Chart Statistika għal analiżi tal-proporzjon tas-sessi



02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 2319

▼M6

Appendiċi 9

Gwida għall-kampjunar tat-tessuti għal determinazzjoni tas-sess ġenetiku u għad-determinazzjoni tas-sess ġenetiku bil-metodu tal-PCR

Il-kampjunar, it-tħejjija u l-ħżin tat-tessuti qabel ma jiġi stabbilit is-sess ġenetiku bil-metodu PCR fil-medaka (Imħejji mil-Laboratorju għall-Organiżmi Akkwatiċi ta' Bayer CropScience AG)

1. B'imqass jaqta' sew ser tinqata' l-pinna anali jew dorsali f'kull ħuta individwali u titqiegħed f'tubu mimli b'100 µl bafer ta' estrazzjoni 1 (ara iktar 'il quddiem dettalji dwar il-preparazzjoni tal-bafer). L-imqass jitnaddaf wara kull ħuta f'bekk mimli H_2O distillat u mnixxef b'biċċa tal-karti.

2. Imbagħad it-tessuti tal-pinna ser jiġu omoġenizzati b'pistil tat-teflon tal-mikrotubu għal-liżi taċ-ċelloli. Għal kull tubu ser jintuża pistil ġdid biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni. Il-pistils ser jitqiegħdu f'0,5 M NaOH għal lejl sħiħ, jitlaħilħu f'H_2O distillat għal ħames minuti u jinħażnu f'etanol jew jiġu sterilizzati wara l-awtoklava sakemm jintużaw.

3. Huwa possibbli wkoll li t-tessut tal-pinna jinħażen mingħajr ebda bafer ta' estrazzjoni 1 f'silġ xott u mbagħad fi friġġ ta' – 80 °C sabiex tiġi evitata kwalunkwe degradazzjoni tad-DNA. Iżda l-estrazzjoni tmur aħjar, jekk testratta d-DNA fl-istess ħin (ara iktar 'il fuq dwar it-tqandil; il-kampjuni għandhom jitħallew joqogħdu fuq is-silġ wara li jinħażnu f'– 80 °C qabel ma l-bafer jinħażen fit-tubi).

4. Wara l-omoġenizzazzjoni, it-tubi kollha jitqiegħdu f'banjumarija u jitgħallew għal 15-il minuta f'100 °C.

5. Imbagħad bil-pipetta ser jiddaħħlu 100 µl bafer ta' estrazzjoni 2 (ara iktar 'il quddiem għal dettalji dwar il-preparazzjoni tal-bafer) f'kull tubu. Il-kampjuni jinħażnu f'temperatura tal-kamra għal 15-il minuta u fl-istess ħin kultant ser jitheżżu bl-id sabiex jitħalltu bil-galbu.

6. Wara, it-tubi kollha jitqiegħdu fil-banju tal-ilma mill-ġdid u jitgħallew għal 15-il minuta oħra f'100 °C.

7. Sakemm issir analiżi ulterjuri, it-tubi ser jiġu ffriżati f'– 20 °C.

Preparazzjoni tal-bafer

PCR-bafer 1:

500 mg N-Lauroilsarkożina (eż. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

ad 100 ml dest. H_2O

→ awtoklava

PCR-bafer 2:

20 g Chelex (eż. Biorad, Munich, GE)

Biex jintefaħ f'100 ml dest. H_2O

→ awtoklava

Stabbiliment tas-sess ġenetiku (bil-metodu PCR) fil-medaka (Imħejji mil-Laboratorju għall-Organiżmi Akkwatiċi ta' Bayer CropScience AG u Universität Würzburg Biozentrum)

It-tubi mħejjin u ffriżati (deskritti fis-sezzjoni ta' hawn fuq) ser jitħallew joqogħdu fuq is-silġ. Wara, ser jiġu ċċentrifugati bl-użu ta' ċentrifugu Eppendorf (30sek b'veloċità massima f'temperatura tal-kamra). Għall-PCR, jintuża s-supernatant ċar isseparat mill-preċipitat. Irid jiġi evitat b'mod assolut milli xi traċċa ta' Chelex (li jinsab fil-preċipitat) tiġi ttrasferita fir-reazzjoni PCR, għaliex din tinterferixxi mal-attività polimeraži-"Taq". Is-supernatant ser jintuża direttament jew jista' jinħażen iffriżat (f'– 20 °C) u jerġa' jitħalla joqgħod f'bosta ċikli mingħajr impatt negattiv fuq id-DNA għal analiżijiet iktar tard.

▼**M6**

1. *Tħejjija tat-"Taħlita tar-Reazzjoni" (25 µl għal kull kampjun):*

	Volum	Konċentrazzjoni Finali
DNA Mudell	0,5 µl-2 µl	
10xPCR-bafer b'MgCl2	2,5 µl	1x
Nukleotidi (kull wieħed ta' dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Primer 'il Quddiem (10 µM) (ara taħt 3-5)	0,5 µl	200 nM
Primer b'Lura (10 µM) (ara taħt 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Ilma (grad tal-PCR)	sa 25 µl	
Taq E- Polimeraži	0,3 µl	1,5U
10xPCR-bafer b'$MgCl_2$: 670mM Tris/HCl (pH8,8 at 25°C), 160mM $(NH_4)_2SO_4$, 25mM MgCl2, 0,1 %Tween 20		

Għal kull PCR (ara taħt 3-5), hemm bżonn tal-primer speċjali bħala taħlita ġdida ta' "Taħlita tar-Reazzjoni" u l-ammont adegwat meħtieġ tad-DNA mudell għal kull kampjun (ara iktar 'il fuq). Il-volumi rispettivi jiġu ttrasferiti f'tubi ġodda bl-użu tal-pipetti. Wara jingħalqu t-tubi kollha, jitħalltu (madwar 0 sek) u jiġu ċċentrifugati (10 sek f'temperatura tal-kamra). Imbagħad ikunu jistgħu jibdew il-programmi-PCR rispettivi. Barra minn hekk, kontroll pożittiv (kampjun ta' DNA eżemplari b'attività magħrufa u riżultati ċari) u kontroll negattiv (1 µl dest. H_2O) ser jintuża f'kull programm PCR.

2. *Tħejjija tal-ġel tal-agarożju (1 %) – Meta jkunu qed isiru l-programmi-PCR:*

— Ħoll 3 g agarożju fi 300 ml × TAE-bafer (1 % ġel tal-agarożju)

— Din is-soluzzjoni għandha titgħalla b'microwave (madwar 2-3 min)

— Ittrasferixxi s-soluzzjoni taħraq f'kaxxa speċjali għall-funditura, li tkun fuq is-silġ

— Wara madwar 20 min, il-ġel tal-agarożju jkun lest sabiex jintuża

— Il-ħżin tal-ġel tal-agarożju f'1 × TAE-bafer sa tmiem il-programmi-PCR

3. *Programm-Aċtina-PCR:*

Din ir-reazzjoni tal-PCR għandha l-għan li turi li d-DNA fil-kampjun ma ġarrabx ħsara.

— Primer speċjali:

"Mact1(superjuri/'il quddiem)" → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

"Mact2(inferjuri/b'lura)" → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programm:

5 min 95 °C

Ċiklu (35 darba):

Denaturazzjoni → 45 sek f'95 °C

Rikottura → 45 sek f'56 °C

Ġebbid → 1 min fi 68 °C

15 min 68 °C

▼M6

4. *Programm-PCR tal-Ġeni X u Y:*

Il-kampjuni bid-DNA sħiħ jintużaw f'dan il-programm-PCR biex jiġu identifikati l-Ġeni X u Y. Id-DNA tal-irġiel għandu juri faxxa doppja u d-DNA tan-nisa għandu juri faxxa waħda (wara tilwin u elettroforeżi bil-ġel). Għal dan il-programm għandu jkun inkluż kontroll pożittiv għall-irġiel (kampjun-XY) u ieħor għan-nisa (kampjun-XX).

— Primer speċjali:

"PG 17.5" (superjuri/'il quddiem) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

"PG 17.6" (inferjuri/b'lura) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programm:

5 min 95 °C

Ċiklu (40 darba):

Denaturazzjoni	→ 45 sek f'95 °C
Rikottura	→ 45 sek f'55 °C
Ġebbid	→ 1 min 30 sek fi 68 °C

15 min 68 °C

5. *Il-programm-PCR tal-Ġene Y bħala "kontroll" għall-programm-PCR tal-Ġeni X u Y:*

Dan il-program-PCR jivverifika r-riżultati tal-"programm-PCR tal-Ġeni X u Y". Il-"kampjuni tal-irġiel" għandhom juru faxxa waħda u l-"kampjuni tan-nisa" ma għandhom juru ebda faxxa (wara t-tilwin u l-elettroforeżi bil-ġel).

— Primer speċjali:

"DMTYa (superjuri/'il quddiem)" → GGC CGG GTC CCC GGG TG

"DMTYd (inferjuri/b'lura)" → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programm

5 min 95 °C

Ċiklu (40 darba):

Denaturazzjoni	→ 45 sek f'95 °C
Rikottura	→ 45 sek f'56 °C
Ġebbid	→ 1 min fi 68 °C

15 min 68 °C

6. *Tilwin tal-kampjuni tal-PCR:*

Soluzzjoni tat-tilwin:

50 % Gliċerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % Bromfenolblu

0,25 % Ksilenksianol

Bil-pipetta daħħal 1 µl soluzzjoni tat-tilwin f'kull tubu

7. *Bidu tal-Elettroforeżi bil-Ġel:*

— Il-ġel tal-agarożju ta' 1 % jiġi ttrasferit f'kompartiment ta' elettroforeżi bil-ġel mimli b'1 × TAE-Bafer

— 10 — 15 µl minn kull kampjun tal-PCR imlewwen ser jiddaħħlu f'taqsima tal-ġel tal-agarożju

— Anki 5 — 15 µl tal-1kb-"Ladder" (Invitroġen) ser jiddaħħlu bil-pipetta f'taqsima separata

— Ibda l-elettroforeżi b'200 V

— Waqqafha wara 30-45 min

▼**M6**

8. *Stabbiliment tal-faxex:*

— Naddaf il-ġel tal-agarożju f'H_2O distillat

— Imbagħad ittrasferixxi l-ġel tal-agarożju fi bromid tal-Etidju għal 15 — 30 min

— Wara għandu jittieħed ritratt tal-ġel tal-agrożju f'kaxxa tad-dawl UV.

— Fl-aħħar, il-kampjuni jiġu analizzati f'paragun mal-faxxa (jew faxex) ta' kontroll pożittiv u l-ladder.

▼M6

Appendiċi 10

Gwida dwar il-kampjunar tat-tessuti sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku bil-metodu tal-PCR fl-ispinarell

Kampjunar tat-tessut u estrazzjoni tad-DNA

Id-DNA jista' jiġi estratt bl-użu ta' firxa ta' reaġenti kummerċjalment disponibbli u sistemi ta' estrazzjoni manwali kif ukoll awtomatizzati. Il-protokoll użat fil-laboratorju Cefas f'Weymouth huwa spjegat hawn taħt, u żdiedu l-approċċi alternattivi fejn kienu xierqa.

1. B'imqass li jaqta' sew, titneħħa biċċa tessut żgħira (10-20 mg) miż-żona dorsolaterali (wara t-tneħħija tar-ras u d-denb għal analiżi tal-VTG) minn kull ħuta individwali. It-tessut jiddaħħal f'tubu u jew jitqiegħed direttament f'nitroġenu likwidu (għall-ħżin fi – 80 °C) jew inkella jimtela b'70 % etanol (għat-trasport u l-ħżin sussegwenti f'4 °C). L-imqass jitnaddaf wara kull ħuta f'70 % etanol u mbagħad f'ilma ddistillat u jitnixxef b'biċċa tal-karti.

2. L-etanol (jekk preżenti) jitneħħa b'aspirazzjoni u t-tessut jiġi diġestit tul il-lejl bi proteinaži K f'400 µl bafer ATL (Qiagen). Alikwota (200 µl) tad-diġest tiġi ttrasferita fi blokka-S b'96 toqba (Qiagen) u d-DNA jiġi estratt f'format ta' 96 toqba bl-żu tal-Qiagen Universal BioRobot u l-QIamp Investigator BioRobot kit. Id-DNA jiġi elwit f'50 µl ilma ħieles DNase u RNase. Jekk jintużaw tessuti ibsin biex jiġi estratt id-DNA (bħal spina jew pinna pettorali) jaf ikun hemm bżonn li l-kampjun jiġi omoġenizzat fil-bafer tal-liżi bl-użu ta' FastPrep® tissue lyser jew sistema ekwivalenti ta' interferent tat-tessuti.

   Inkella,

   (a) it-tessut jiġi diġestit tul il-lejl bil-proteinaži K f'400 µl G2 bafer tal-liżi (Qiagen) u d-DNA jiġi estratt minn 200 µl tad-diġest bl-użu tal-EZ-1 DNA easy tissue mini kit u l-EZ-1 biorobot jew inkella bid-DNA easy mini tissue kit. Id-DNA jiġi elwit f'volum ta' 50 µl.

   (b) It-tessuti jiġu pproċessati bl-użu tar-reaġent DNAzol. Għal ftit żmien, il-kampjuni tat-tessut jiġu liżati f'1ml DNAzol għal 10 minuti f'mikrotubu ċentrifugu ta' 1,5 ml u mbagħad jiġu ċċentrifugati fi 13 000 rmp għal 5 minuti biex titneħħa kwalunkwe materja partikolata. Imbagħad, il-kampjun liżat jiġi ttrasferit f'mikrotubu ċentrifugu ġdid ta' 1,5 ml li fih 500 µl 100 % etanol ta' grad molekolari u mbagħad jiġi ċċentrifugat fi 13 000 rmp għal 10 minuti sabiex jiġi ppreċipitat id-DNA. L-etanol jitneħħa u jiġi sostitwit ma' 400 µl 70 % etanol ta' grad molekolari, iċċentrifugat fi 13 000 rpm għal 5 minuti u l-gerbuba tad-DNA tiġi dissolta f'50 µl ilma ħieles DNase u RNase molekolari. Mill-ġdid, meta jintużaw tessuti ibsin (pinna pettorali), jaf ikun hemm bżonn li l-kampjun jiġi omoġenizzat fil-bafer tal-liżi bl-użu ta' liżatur tat-tessut FastPrep® jew sistema ta' interferent tat-tessut ekwivalenti qabel ma jiġi estratt id-DNA.

3. Id-DNA jinħażen f'– 20 °C sa kemm hemm bżonn.

Nota importanti: iridu jintlibsu l-ingwanti matul il-proċeduri.

Analiżi tar-reazzjoni katina tal-polimeraži (PCR)

Saru amplifikazzjonijiet bl-użu ta' 2,5 µl mill-estratt tad-DNA f' volum ta' reazzjoni ta' 50 µl bl-użu tal-Idh locus primers (kif deskritt minn Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Primer 'il quddiem	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Primer b'lura	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼M6

Hemm bosta fornituri ta' reaġenti xierqa tal-PCR. Il-metodu spjegat hawn taħt huwa dak li bħalissa jintuża fil-laboratorju Cefas f'Weymouth.

1. *Tħejjija tat-"Taħlita ta' Reazzjoni" (50 µl għal kull kampjun):*

Titħejja supertaħlita kif ġej. Din tista' titħejja minn qabel u tinħażen iffriżata f'– 20 °C sakemm hemm bżonn. Agħmel supertaħlita suffiċjenti għal kontroll negattiv (ilma ta' grad tal-bijoloġija molekolari biss).

	Volum (konċ. tal-istokk)/ kampjun	Konċentrazzjoni Finali
5xGoTaq® Bafer ta' Reazzjoni	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM kull wieħed)	250 µM kull wieħed
Primer 'il Quddiem	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Primer b'Lura	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Ilma ta' grad tal-bijoloġija molekolari	30,75 µl	
GoTaq polimeraży	0,25 µl	1,25 U

— Iddistribwixxi 47,5 µl f'tubu tal-PCR ittikkettat b'ħajt irqiq ta' 0,5 ml.

— Żid 2,5 µl tad-DNA ippurifikat fit-tubu ttikkettat kif xieraq. Irrepeti għall-kampjuni kollha u l-kontroll negattiv.

— Fuqhom itfa' 2 taqtiriet żejt minerali. Inkella, uża ċiklatur termali b'għatu msaħħan.

— Agħlaq l-għotjien.

— Il-kampjuni ġew denaturati f'ċiklatur termali Peltier PTC-225 f'94 ± 2 °C għal 5 minuti segwiti minn 39 ċiklu ta' 94 ± 2 °C għal minuta, 55 ± 2 °C għal minuta, 72 ± 2 °C għal minuta, u estensjoni finali ta' 72 ± 2 °C għal 10 minuti.

2. *Tħejjija tal-ġel tal-agarożju (2 %):*

Tradizzjonalment, il-prodotti tal-PCR jiġu riżolti fuq 20 % ġel tal-agarożju li fih etidju tal-bromur.

Jistgħu jintużaw ukoll sistemi ta' elettroforeżi bbażati fuq il-kapillari.

— Iżen 2 g agarożju f'100 ml 1 × TAE-bafer

— Saħħan f'microwave (madwar 2-3 min) biex tħoll l-agarożju.

— Żid 2 taqtiriet tal-konċentrazzjoni finali tal-bromur tal-etidju 0,5 µg/ml

— Ittrasferixxi s-soluzzjoni taħraq fit-tagħmir ta' funditura tal-ġel.

— Ħalli l-ġel jibbies

3. *Elettroforeżi bil-ġel:*

— Ittrasferixxi l-ġel tal-agrożju fit-tagħmir tal-elettroforeżi u għaddsu f'1 × TAE-bafer

— Tella' 20 µl minn kull kampjun f'toqba separata, billi żżid markatur tal-piż molekolari (100 bp DNA ladder, Promega) f'toqba vojta.

— L-elettroforeżi ssir f'120 V għal 30-45 minuta.

▼**M6**

4. *Viżwalizzazzjoni tal-prodotti ta' amplifikazzjoni*

Jekk il-bromur tal-etidju ġie inkorporat fil-ġel tal-agarożju kif spjegat iktar 'il fuq, il-prodotti tad-DNA jiġu vviżwalizzati taħt sors tal-UV. Inkella, il-ġel tal-agarożju jingħata lewn billi l-ġel jinkesa b' soluzzjoni dilwita ta' bromur tal-etidju (0,5 μg/ml fl-ilma) għal 30 minuta qabel il-viżwalizzazzjoni.

▼**M6**

Appendiċi 11

Gwida għall-proċedura ta' fertilizzazzjoni artifiċjali għall-ispinarell

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddeskrivi l-proċeduri sabiex jinkiseb bajd iffertilizzat mill-ispinarell sabiex jintuża fl-FSDT.

Proċeduri

Kisba ta' sperma mill-irġiel

1. Jiġi ewtanizzat raġel b'kulur xieraq mill-popolazzjoni mixtieqa.

2. It-testikoli jiġu dissezzjonati minn kull naħa tal-ħuta. *It-testikoli ġeneralment ikunu strutturi b'pigmentazzjoni skura u f'forma ta' lasta li mill-ewwel jidhru fil-linja tan-nofs laterali tal-ġisem*. Uża wieħed mill-metodi li ġejjin:

3. Billi tuża par imqass jaqta' sew, ibda fil-kloaka u agħmel inċiżjoni ta' 1,5 cm b'qatgħa waħda f'angolu ta' madwar 45 grad.

4. Uża sikkina kirurġika biex tagħmel inċiżjoni żgħira fil-ġenb tal-ħuta ftit wara l-pelvi u ventrali mis-saffi laterali.

5. It-testikoli jitneħħew bl-użu ta' forċipi tajbin u jitqiegħdu f'dixx petri.

6. Kull testikola tinksa b'100 µl **soluzzjoni finali ta' Hank** (*) magħmula friska.

7. It-testikoli jinqasmu bir-reqqa bl-użu ta' xafra jew sikkina kirurġika. Dan ser jeħles l-isperma u jagħti dehra mċajpra lis-soluzzjoni ta' Hank.

8. Il-fluwidu li fih l-isperma tiddaħħal f'tubu, filwaqt li jiġi evitat milli tiddaħħal xi biċċa mit-testikoli meta tintuża l-pipetta.

9. 800 µl mis-soluzzjoni finali ta' Hank jiddaħħlu fit-tubu u jitħawdu sew.

10. Jekk ikun hemm bżonn, ir-raġel jista' jiġi ppreservat billi jiġi ffissat f'100 % etanol jew fissattiv mixtieq ieħor. Dan huwa ta' importanza partikolari jekk l-istudju jkun qiegħed jassenja l-oriġini mill-ġenituri tal-ħut żgħir.

Nota importanti: *Għad li ħafna mis-soluzzjonijiet ewlenin meħtieġa jistgħu jsiru minn qabel*, ***l-istokk 5*** *u mbagħad* ***is-soluzzjoni finali*** *għandhom isiru* ***friski*** *dakinhar tal-użu*.

Stokk 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Ilma distillat (DW)	100 ml
Stokk 2	
Na_2HPO_4 (anidruż)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DW	100 ml
Stokk 3	
$CaCl_2$	0,72 g
DW	50 ml

(*) Is-Soluzzjoni Mmellħa Bbaferjata ta' Hank (HBSS):
L-HBSS hija meħtieġa sabiex tiġi ppreservata l-isperma filwaqt li titħejja l-fertilizzazzjoni.

▼**M6**

Stokk 4

$MgSO_4$ $7H_2O$	1,23 g
DW	50 ml

Stokk 5 (ippreparat frisk)

$NaHCO_3$	0,35 g
DW	10 ml

Nota: Jekk diġà għandek uħud mill-melħiet ta' hawn fuq iżda b'kontenut ta' ilma differenti (jiġifieri $2H_2O$ minflok anidru) xorta tista' tużahom iżda l-ewwel trid taġġusta l-piż fuq il-bażi tal-piż molekolari).

Għas-soluzzjoni finali ta' Hank, għaqqad fl-ordni li ġejja:

stokk 1	1,0 ml
stokk 2	0,1 ml
stokk 3	0,1 ml
DW	8,6 ml
stokk 4	0,1 ml
stokk 5	0,1 ml

Ħawdu sew qabel l-użu.

Fertilizzazzjoni

1. Mill-popolazzjoni mixtieqa jiġu identifikati n-nisa kbar u tqal; in-nisa jkunu lesti għat-tagħfis biss meta tkun tisa' tara l-bajd ħiereġ mill-kloaka. In-nisa lesti għandhom il-karatteristika tal-qagħda "b'rashom mgħollija".

2. Mexxi sebgħek jew sebgħek il-kbir bil-mod fuq il-ġenb tal-ħuta lejn denbha biex tħeġġeġ il-ħruġ ta' borża tal-bajd f'dixx petri ġdid. Irrepeti fuq in-naħa l-oħra u qiegħed il-ħuta lura fit-tank tagħha.

3. Il-bajd jista' jitferrex (biex jifforma monosaff) bl-użu ta' pinzell fin. Importanti li tipprova tesponi kemm-il bajda possibbli għall-isperma u b'hekk jgħin li tiġi massimizzata ż-żona tal-wiċċ tal-uċuħ. Nota importanti: Żomm il-bajd umdu billi tqiegħed biċċa karta niedja madwarhom (importanti li l-bajd ma jmissx mal-ilma direttament peress li dan jista' jwebbes il-korjon b'mod prematur u jipprevjeni l-fertilizzazzjoni). Hemm varjazzjoni kbira fin-numru ta' bajd li kull mara tista' tipproduċi iżda, bħala medja, faċilment għandhom jinkisbu madwar 150 bajda minn mara tqila.

4. 25µl sperma fit-taħlita ta' Hank titferrex b'mod indaqs fuq il-wiċċ sħiħ tal-bajd bl-użu tal-pinzell. Il-bajd malajr jibbies u jibdel il-kulur (fi żmien minuta) ladarba tibda l-fertilizzazzjoni. Jekk in-numru stmat ta' bajd ikun ta' iktar minn 150, irrepeti l-proċedura. B'mod simili, jekk il-bajd ma jibbiesx fi żmien minuta, żid ftit iktar sperma. Nota importanti: Iż-żieda ta' iktar sperma mhux bilfors itejjeb ir-rata ta' fertilizzazzjoni.

5. Il-bajd u s-soluzzjoni tal-isperma għandhom jitħallew "jinteraġixxu" għal tal-inqas 15-il minuta u l-bajd iffertilizzat għandu jitqiegħed fl-akkwarji ta' espożizzjoni fi żmien siegħa u nofs wara l-fertilizzazzjoni.

6. Il-proċedura tiġi ripetuta bl-użu ta' mara oħra sakemm jinġabar in-numru mixtieq ta' bajd.

7. Ħalli ftit bajd mill-aħħar lott u ffissahom f'10 % aċidu aċetiku.

▼M6

L-għadd u d-distribuzzjoni tal-bajd fl-akkwarji tat-test

1. Il-bajd għandu jitqassam b'mod indaqs bejn kull livell tat-trattament sabiex jiġi evitat preġudizzju ġenetiku. Kull lott ta' bajd iffertilizzat għandu jiġi sseparat fi gruppi ndaqs (daqs il-livelli tat-trattament) bl-użu ta' strument bil-ponta (jiġifieri forċipi tal-entomoloġija b'xafra wiesgħa jew l-użu ta' loop ta' inokulazzjoni). Jekk għandek mira ta' 4 irreplikati għal kull trattament, b'20 bajda kull wieħed, f'dak il-każ trid tiddistribwixxi 80 bajda għal kull akkwarju ta' espożizzjoni. Nota importanti: Huwa rakkomandat li jiżdiedu 20 % oħra (jiġifieri 96 bajda għal kull livell tat-trattament) sakemm ma tkunx żgur li ser tikseb rati ta' fertilizzazzjoni ta' 100 %.

2. Il-bajd tal-ispinarell malajr jista' jieħu infezzjoni fungali barra l-bejta mħarsa mill-missier. F'dan ir-rigward, it-trattament tal-bajd kollu bil-metilen blu matul l-ewwel ħamest ijiem tat-test huwa ta' importanza assoluta. Soluzzjoni ewlenija tal-metilen blu titħejja f'1 mg/ml u tiddaħħal fl-akkwarji ta' espożizzjoni sabiex tingħata konċentrazzjoni finali massima ta' 2,125 mg/l. Nota importanti: L-ispinarelli ma għandhomx ikunu esposti għal metilen blu ladarba jfaqqsu u b'hekk is-sistema għandha tkun ħielsa minn metilen blu sal-jum 6.

3. Il-bajd jiġi spezzjonat kuljum u kwalunkwe bajd mejjet jew mhux iffertilizzat irid jiġi rreġistrat bħalatali. Nota importanti: Il-bajd qatt ma għandu jkun barra l-ilma sakemm ifaqqas, lanqas għal perjodi qosra ħafna.

▼**M6**

C.42. **BIJODEGRADABILITÀ FL-ILMA BAĦAR**

INTRODUZZJONI ĠENERALI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 306 tal-OECD (1992). Meta ġew żviluppati l-metodi ta' ttestjar oriġinali, ma kienx magħruf kemm ir-riżultati mit-testijiet ta' tgħarbil għal bijodegradabilità lesta bl-użu ta' ilma ħelu, u effluwent tad-drenaġġ jew ħama attivat bħala inokulu, jistgħu jiġu applikati għall-ambjent marittimu. Fuq dan il-punt ġew irrapportati riżultati li jvarjaw (eż. (1)).

2. Ħafna ilmijiet industrijali mormijin, li fihom firxa ta' sustanzi kimiċi, jilħqu l-baħar jew permezz ta' skariku dirett jew permezz ta' estwarji u xmajjar li fihom iż-żminijiet ta' residenza huma baxxi meta mqabblin mal-perjodu meħtieġ għal bijodegradazzjoni sħiħa ta' ħafna mis-sustanzi kimiċi preżenti. Minħabba l-għarfien dejjem ikbar tal-bżonn li jiġi protett l-ambjent marittimu kontra volumi dejjem ikbar ta' sustanzi kimiċi u l-ħtieġa li tiġi stmata l-konċentrazzjoni probabbli tas-sustanzi kimiċi fil-baħar, ġew żviluppati metodi ta' ttestjar għall-bijodegradabilità fl-ilma baħar.

3. Il-metodi deskritti hawnhekk jużaw ilma bħala naturali kemm bħala l-faži milwiema kif ukoll bħala s-sors tal-mikroorganiżmi. Sabiex tinżamm konformità mal-metodi għal bijodegradabilità lesta fl-ilma ħelu, ġie investigat l-użu ta' ilma baħar ultrafiltrat u ċċentrifugat, u hekk ukoll ġie investigat l-użu ta' naqal marittimu bħala inokulu. Dawn l-investigazzjonijiet ma rnexxewx. Għaldaqstant, il-midjum tat-test huwa ilma baħar naturali ttrattat minn qabel sabiex jitneħħew partikoli mhux maħdumin.

4. Sabiex tiġi vvalutata l-bijodegradabilità finali bil-Metodu Flask Mheżżeż, iridu jintużaw konċentrazzjonijiet relattivament għoljin tas-sustanza tat-test minħabba s-sensittività baxxa tal-metodu analitiku tal-karbonju organiku dissolt (DOC). Min-naħa tiegħu, dan jeħtieġ li mal-ilma baħar jiżdiedu nutrijenti minerali (N u P), li l-konċentrazzjonijiet baxxi tagħhom ikunu qed jillimitaw it-tneħħija tad-DOC. Jista' jkun hemm bżonn li jiżdiedu wkoll in-nutrijenti fil-Metodu Flixkun Magħluq minħabba l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test miżjuda.

5. B'hekk, il-metodi mhumiex ittestjati għal bijodegradabilità lesta peress li ma jiżdied ebda inokulu mal-mikroorganiżmi diġà preżenti fl-ilma baħar. It-testijiet lanqas ma jissimulaw l-ambjent marittimu peress li jiżdiedu n-nutrijenti u l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test hija ferm ogħla minn dik li tkun preżenti fil-baħar. Għal dawn ir-raġunijiet, il-metodi huma proposti taħt subsezzjoni ġdida "Bijodegradabilità fl-Ilma Baħar".

APPLIKAZZJONI

6. Ir-riżultati tat-testijiet, li jiġu applikati għaliex il-mudell ta' użu u rimi tas-sustanza inkwistjoni indika rotta lejn il-baħar, taw l-ewwel impressjoni ta' bijodegradabilità fl-ilma baħar. Jekk ir-riżultat ikun pożittiv (tneħħija ta' > 70 % DOC; > 60 % ThOD — domanda teorika ta' ossiġenu), jista' jiġi konkluż li hemm potenzjal għal bijodegradazzjoni fl-ambjent marittimu. Madankollu, riżultat negattiv ma jipprekludix potenzjal bħal dan iżda jindika li hemm bżonn isiru iktar studji, pereżempju, bl-użu tal-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test possibbli.

▼M6

7. Fi kwalunkwe każ, jekk hemm bżonn ta' valur iktar definittiv għar-rata jew il-grad ta' bijodegradazzjoni fl-ilma baħar f'sit partikolari, ikollhom jiġu applikati metodi oħrajn li huma iktar kumplessi u sofistikati, u b'hekk li jiswew iktar flus. Pereżempju, test ta' simulazzjoni jista' jiġi applikat bl-użu ta' konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li tkun eqreb il-konċentrazzjoni ambjentali probabbli. Barra minn hekk, jista' jintuża ilma baħar mhux iffortifikat u mhux ittrattat minn qabel meħud mill-post ta' interess u l-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi segwita b'analiżi kimika speċifika. Għall-bijodegradabilità finali, ikunu meħtieġa sustanzi ttikkettati-^{14}C sabiex ikunu jistgħu jitkejlu r-rati tal-għibien tal-^{14}C organiċi solubbli u l-produzzjoni tal-$^{14}CO_2$ f'konċentrazzjonijiet ambjentalment realistiċi.

GĦAŻLA TAL-METODI

8. L-għażla ta' liema metodu għandu jintuża tiddependi minn għadd ta' fatturi; tingħata t-Tabella li ġejja biex tgħin fl-għażla. Filwaqt li s-sustanzi tas-solubilità tal-ilma inqas mill-ekwivalenti ta' madwar 5 mg C/l ma jistgħux jiġu ttestjati fil-Metodu tal-Flask Mheżżeż, tal-inqas, fil-prinċipju, sustanzi ftit li xejn solubbli jistgħu jiġu ttestjati fil-Metodu tal-Flixkun Magħluq.

Tabella

Vantaġġi u żvantaġġi tat-test tal-flask mheżżeż u l-flixkun magħluq

METODU	VANTAĠĠI	ŻVANTAĠĠI
FLASK MHEŻŻEŻ	— apparat sempliċi ħlief analizzatur tal-K — durata ta' 60 jum mhix problema — ebda xkiel min-nitrifikazzjoni — jista' jiġi adattat għal sustanzi volatili	— jeħtieġ analizzatur tal-K — juża 5-40 mg DOC/1, jista' jkun ta' xkiel — stabbiliment tad-DOC diffiċli f'konċentrazzjonijiet baxxi f'ilma baħar (effett tal-klorur) — kultant DOC għoli f'ilma baħar
FLIXKUN MAGĦLUQ	— apparat sempliċi — stabbiliment bi tmiem sempliċi — juża konċentrazzjoni baxxa tas-sustanza tat-test (2 mg/l) u b'hekk hemm inqas possibbiltà ta' varjazzjoni — faċilment adattat għal sustanzi volatili	— jaf ikun diffiċli biex tinżamm l-għeluq tal-arja tal-fliexken — it-tkabbir mal-ħitan ta' batterji jista' jwassal għal valuri foloz — il-valuri inbjank ta' teħid tal-O_2 jistgħu jkunu għoljin speċjalment wara 28 jum; jista' jiġi evitat aktar ma jiqdiem l-ilma baħar — xkiel possibbli mit-teħid ta' O_2 bin-nitrifikazzjoni

METODU TAL-FLASK MHEŻŻEŻ

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu huwa varjant tal-ilma baħar tat-Test ta' Tgħarbil Immodifikat tal-OECD deskritt fil-Kapitolu C.4B ta' dan l-Anness (2). Ġie ffinalizzat wara ringtest organizzat għall-Kummissjoni Ewropea (KE) mill-Istitut tad-Danimarka għall-Kwalità tal-Ilma (3).

2. Bl-istess mod bħall-Metodu marittimu tal-Flixkun Magħluq li jakkumpanjah, ir-riżultati minn dan it-test ma għandhomx jittieħdu bħala indikaturi ta' bijodegradabilità lesta, iżda jridu jintużaw b'mod speċifiku sabiex tinkiseb informazzjoni dwar il-bijodegradabilità tas-sustanzi f'ambjenti marittimi.

▼M6

PRINĊIPJU TAL-METODU

3. Ammont prestabbilit tas-sustanza tat-test huwa dissolt fil-midjum tat-test biex tinħareġ konċentrazzjoni ta' 5-40 mg karbonju organiku dissolt (DOC)/l. Jekk il-limiti tas-sensittività tal-analiżijiet tal-karbonju organiku jitjiebu, l-użu ta' konċentrazzjonijiet inqas tas-sustanza tat-test jista' jkun ta' vantaġġ, b'mod partikolari għal sustanzi inibitorji. Is-soluzzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tat-test tiġi inkubata waqt tħawwid fid-dlam jew f'dawl bati f'kundizzjonijiet aerobiċi b'temperatura fissa (ikkontrollata għal ± 2°C) li normalment tkun fi ħdan il-medda ta' 15-20°C. F'każijiet li fihom l-objettiv tal-istudju jkun li jiġu ssimulati sitwazzjonijiet ambjentali, jistgħu jsiru testijiet lil hinn minn din il-medda normali tat-temperatura. Id-durata massima rrakkomandata hija ta' madwar 60 jum. Id-degradazzjoni hija segwita minn kejliet tad-DOC (degradazzjoni finali) u, f'xi każijiet, minn analiżi speċifika (degradazzjoni primarja).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

4. Sabiex isir magħruf jekk it-test jistax jiġi applikat għal sustanza partikolari, iridu jkunu magħrufin uħud mill-karatteristiċi tiegħu. Il-kontenut ta' karbonju organiku tas-sustanza jrid jiġi stabbilit, il-volatilità tagħha trid tkun tali li ma jseħħx telf sinifikanti matul it-test u s-solubilità tagħha fl-ilma trid tkun ikbar mill-ekwivalenti ta' 25-40 mg C/l. Barra minn hekk, il-materjal tat-test ma għandux jaqbad b'mod sinifikanti ma' uċuħ tal-ħġieġ. Hemm bżonn ta' informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet relevanti ta' komponenti kbar tal-materjal tat-test sabiex ikunu jistgħu jiġu interpretati r-riżultati, speċjalment meta r-riżultat ikun qrib il-livell ta' "suċċess".

5. Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għall-batterji, pereżempju kif imkejla fit-testijiet tar-rata ta' respirazzjoni fuq terminu qasir (4), tista' tkun siewja meta jingħażlu l-konċentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista' tkun essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri ta' bijodegradazzjoni baxxi. Madankollu, it-tali informazzjoni mhux dejjem tkun biżżejjed sabiex jiġu interpretati riżultati miksubin fit-test ta' bijodegradazzjoni u l-proċedura deskritta fil-paragrafu 18 hija iktar adattata.

SUSTANZI TA' REFERENZA

6. Iridu jintużaw sustanzi xierqa ta' referenza sabiex tiġi kkontrollata l-attività mikrobjali tal-kampjun ta' ilma baħar. Benżoat tas-sodju, aċetat tas-sodju u anilina huma eżempji ta' sustanzi li jistgħu jintużaw għal dan il-għan. Is-sustanzi ta' referenza jridu jiġu degradati fi ħdan perjodu ta' żmien raġonevolment qasir, inkella huwa rrakkomandat li t-test jiġi ripetut bl-użu ta' kampjun ieħor ta' ilma baħar.

7. Fir-ringtest tal-KE li fih ittieħdu kampjuni ta' ilma baħar f'postijiet differenti u fi żminijiet differenti tas-sena (3), il-fażi ta' dewmien (t_L) u ż-żmien sakemm tinkiseb degradazzjoni ta' 50 fil-mija (t_{50}), ħlief il-fażi ta' dewmien, kienu ta' bejn jum u 4 ijiem u bejn jum u 7 rispettivament għall-benżoat tas-sodju. Għal anilina, t_L varjat bejn 0 sa 10 ijiem, filwaqt li t_{50} varjat bejn jum u 10.

RIPRODUĊIBILITÀ U SENSITTIVITÀ TAL-METODU

8. Ir-riproduċibilità tal-metodu ġiet stabbilita fir-ringtest (3). L-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, li għaliha dan il-metodu jista' jintuża b'analiżi tad-DOC, hija fil-parti l-kbira ddeterminata mil-limitu ta' identifikazzjoni tal-analiżi tal-karbonju organiku (madwar 0,5 mg C/l bħalissa) u l-konċentrazzjoni tal-karbonju organiku dissolt fl-ilma baħar użat (normalment fl-ordni ta' 3-5 mg/l għal ilma mill-baħar internazzjonali). Il-konċentrazzjoni ta' sfond tad-DOC ma għandhiex taqbeż madwar 20 % tal-konċentrazzjoni

▼M6

totali tad-DOC wara li tiddaħħal is-sustanza tat-test. Jekk dan ma jkunx fattibbli, il-konċentrazzjoni ta' sfond tad-DOC kultant tkun tista' titnaqqas iktar ma jiqdiem l-ilma baħar qabel l-ittestjar. Jekk il-metodu jintuża b'analiżi kimika speċifika biss (li biha titkejjel id-degradazzjoni primarja), l-investigatur irid jiddokumenta, billi jforni informazzjoni addizzjonali, jekk tistax tkun mistennija degradabilità finali. Din l-informazzjoni addizzjonali tista' tikkonsisti fir-riżultati minn testijiet oħrajn għal bijodegradabilità lesta jew inerenti.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

9. Apparat normali tal-laboratorju u

   a. Magna xejker li tiflaħ flasks Erlenmeyer ta' 0,5-2 litri, jew b'kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata f'kambra b'temperatura kostanti ta' 15-20 °C ikkontrollata għal ± 2 °C;

   b. Flasks Erlenmeyer ta' 0,5-2 litri b'għonq irqiq

   c. Apparat għall-filtrazzjoni tal-membrana, jew ċentrifugu;

   d. Filtri tal-membrana, 0,2-0,45μm;

   e. Analizzatur tal-karbonju;

   f. Tagħmir għal analiżi speċifika (mhux obbligatorju).

Ilma baħar

10. Ħu kampjun ta' ilma baħar f'kontenitur imnaddaf sew u ħudu fil-laboratorju, idealment fi żmien jum jew jumejn mit-teħid. Matul it-trasport, tħallix it-temperatura tal-kampjun taqbeż wisq it-temperatura li għandha tintuża fit-test. Identifika l-post tal-kampjunar bi preċiżjoni u ddeskrivih f'termini tal-istatus ta' tniġġis u n-nutrijenti tiegħu. B'mod partikolari għal ilmijiet tal-kosta, f'din il-karatterizzazzjoni għandek tinkludi l-għadd tal-kolonja mikrobjali eterotrofika u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet ta' nitrat, ammonijaka u fosfat dissolti.

11. Ipprovdi l-informazzjoni li ġejja għall-kampjun ta' ilma baħar stess:

   — id-data tat-teħid;

   — il-fond tat-teħid;

   — id-dehra tal-kampjun — imċajpar, eċċ.;

   — it-temperatura f'ħin it-teħid;

   — is-salinità;

   — id-DOC;

   — id-dewmien bejn it-teħid u l-użu fit-test.

12. Jekk il-kontenut tad-DOC tal-kampjun ta' ilma baħar jinstab li huwa għoli (paragrafu 8), huwa rrakkomandat li l-ilma baħar jitħalla jiqdiem b'ġimgħa qabel jintuża. Ħallih jiqdiem billi taħżnu f'kundizzjonijiet aerobiċi fit-temperaturi tat-test u fid-dlam jew f'dawl bati. Jekk hemm bżonn, żomm il-kundizzjonijiet aerobiċi permezz ta' għoti tal-arja ħafifa. Meta jkun qed jiqdiem,

▼M6

jonqos il-kontenut tal-materjal organiku faċilment degradabbli. Fir-ringtest (3), ma nstabet ebda differenza bejn il-potenzjal ta' degradazzjoni tal-kampjuni ta' ilma baħar li qdiemu u dawk miġburin friski. Qabel jintuża, ittratta l-ilma baħar minn qabel biex tneħħi partikoli mhux maħdumin, eż. b'filtrazzjoni permezz ta' filtru tan-najlon jew karta filtru ħarxa (mhux membrana jew filtri GF-C), jew b'sedimentazzjoni u dikantar. Trid tiġi rrapportata l-proċedura użata. Il-pretrattament agħmlu wara li jiqdiem, jekk jintuża.

Soluzzjonijiet ewlenin għal nutrijenti minerali

13. Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin li ġejjin, billi tuża reaġenti ta' grad analitiku:

(a) Potassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4 8,50 g

Dipotassju idroġenu ortofosfat, K_2HPO_4 21,75 g

Disodju idroġenu ortofosfat diidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Klorid tal-ammonium, NH_4Cl 0,50 g

Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.

(b) Klorur tal-kalċju, $CaCl_2$ 27,50 g

Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.

(c) Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.

(d) Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.

Preċipitazzjoni fis-soluzzjoni (d) tista' tiġi evitata billi tiżdied qatra ta' HCl ikkonċentrat jew 0,4 g etilenedjaminetetra-aċidu aċetiku (EDTA, melħ disodju) għal kull litru. Jekk jifforma preċipitat f'soluzzjoni ewlenija, ibdilha ma' soluzzjoni magħmula ġdida.

Preparazzjoni tal-midjum tat-test

14. Żid 1 ml ta' kull waħda mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' hawn fuq għal kull litru ilma baħar pretrattat.

Inokulu

15. Iżżidx inokulu speċifiku minbarra l-mikroorganiżmi diġà preżenti fl-ilma baħar. Sib (mhux bilfors) in-numru ta' eterotrofi li jifformaw kolonji fil-midjum tat-test tal-ilma baħar (u idealment anki fil-kampjuni oriġinali tal-ilma baħar) eż. bl-għadd tal-platti, bl-użu ta' agar marittimu. Dan ikun partikolarment utli għal kampjuni minn siti kostali jew imniġġsin. Ivverifika l-attività mikrobjali eterotrofika fl-ilma baħar billi tagħmel test b'sustanza ta' referenza.

▼M6

Preparazzjoni tal-flasks

16. Ara li l-oġġetti kollha tal-ħġieġ huma nodfa tazza, mhux bilfors sterelizzati, (eż. bl-użu ta' aċidu idrokloriku alkoħoliku), imlaħalħin u mnixxfin qabel tużahom sabiex tevita kontaminazzjoni mar-residwi minn testijiet li saru qabel. Il-flasks iridu jitnaddfu anki qabel jintużaw għall-ewwel darba.

17. Evalwa s-sustanzi tat-test fi flasks tad-duplikati fl-istess ħin, flimkien ma' flask wieħed għas-sustanza ta' referenza. Agħmel test inbjank, f'duplikat, mingħajr sustanza tat-test u lanqas dik ta' referenza sabiex tistabbilixxi l-inbjanki analitiċi. Dissolvi s-sustanzi tat-test fil-midjum tat-test — jistgħu jiddaħħlu b'mod konvenjenti permezz ta' soluzzjoni ewlenija kkonċentrata — biex jingħataw il-konċentrazzjonijiet ta' bidu mixtieqa li normalment ikunu ta' 5-40 mg DOC/l. Ittestja s-sustanza ta' referenza b'mod normali f'konċentrazzjoni tal-bidu li tikkorrispondi għal 20 mg DOC/l. Jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta' sustanza tat-test u/jew sustanza ta' referenza, ara li s-salinità tal-midjum tal-ilma baħar ma tinbidilx wisq.

18. Jekk jistgħu jkunu mistennijin effetti tossiċi jew jekk dawn ma jkunux jistgħu jiġu eliminati b'ċertezza, jista' jkun aħjar li fid-disinn tat-test jiġi inkluż esperiment ta' inibizzjoni f'duplikat ukoll. Daħħal is-sustanzi tat-test u ta' referenza fl-istess reċipjent, bil-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' referenza li normalment tkun daqs fit-test tal-kontroll (jiġifieri 20 mg DOC/l) sabiex tkun tista' tagħmel paragun.

19. Qassam ammonti adegwati tas-soluzzjonijiet tat-test fil-flasks Erlenmeyer (sa madwar nofs il-volum tal-flask huwa ammont konvenjenti) u mbagħad għatti kull flask b'għatu laxk (eż. fojl tal-aluminju) li jippermetti li jiġi skambjat gass bejn il-flask u l-arja tal-madwar. (Tappijiet magħmulin mit-tajjar mhumiex tajbin jekk tintuża analiżi tad-DOC). Qiegħed ir-reċipjenti fuq ix-xejker u heżżeż kontinwament bil-galbu (eż. 100 rpm) tul it-test kollu. Ikkontrolla t-temperatura (15-20°C u fi ħdan ± 2°C), u ipproteġi r-reċipjenti mid-dawl sabiex tevita milli jikbru algi. Ara li l-arja hija ħielsa minn materjali tossiċi.

Test fiżikokimiku tal-kontroll (mhux obbligatorju)

20. Jekk hemm suspett ta' degradazzjoni abijotika jew mekkaniżmi ta' telf, bħal idroliżi (problema b'analiżi speċifika biss), volatilizzazzjoni jew assorbiment, huwa rakkomandat li tagħmel esperiment fiżikokimiku tal-kontroll. Dan jista' jsir billi jiddaħħal klorur tal-merkurju (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) f'reċipjenti bis-sustanza tat-test sabiex titwaqqaf l-attività mikrobjali. Tnaqqis kbir fid-DOC jew konċentrazzjoni speċifika tas-substrat fit-test tal-kontroll fiżikokimiku jindika mekkaniżmi ta' tneħħija abijotiċi. (Jekk jintuża klorur tal-merkurju, għandha tingħata attenzjoni għal interferenzi jew pożizzjonar katalistiku fl-analiżi tad-DOC.)

Numru ta' flasks

21. F'sensiela tipika ta' testijiet, jintużaw il-flasks li ġejjin:

Flasks 1 u 2 li fihom is-sustanza tat-test (sospensjoni tat-test);

Flasks 3 u 4 li fihom ilma baħar biss (inkbjank);

Flask 5 li fihom is-sustanza ta' referenza (kontroll tal-proċedura);

Flask 6 li fih is-sustanza tat-test u ta' referenza (kontroll tat-tossiċità) — mhux obbligatorju;

Flask 7 li fih is-sustanza tat-test u l-aġent sterelizzanti (kontroll sterili abijotiku)-mhux obbligatorju.

([1]) Klorur tal-merkurju (II) ($HgCl_2$) huwa sustanza ferm tossika li għandha titqandel bil-prekawzjonijiet xierqa. Skart milwiem li fih din is-sustanza kimika għandu jintrema kif xieraq; ma għandux jintrema fis-sistema tal-ilma mormi.

▼M6

Analiżi tad-DOC

22. Matul it-test, ħu kampjuni kull ċertu perjodu xieraq għal analiżi tad-DOC (Appendiċi 1). Dejjem għandek tieħu kampjuni fil-bidu tat-test (jum 0) u fil-jum 60. Tal-inqas hemm bżonn ta' ħames kampjuni b'kollox sabiex jiddeskrivu l-medda ta' żmien tad-degradazzjoni. Ma tista' tiġi stabbilita ebda skeda ta' żmien fissa peress li r-rata ta' bijodegradazzjoni tvarja. Iddetermina d-DOC f'duplikat f'kull kampjun.

Kampjunar

23. Il-volum meħtieġ tal-kampjuni jiddependi mill-metodu analitiku (analiżi speċifika), mill-analizzatur tal-karbonju użat, u mill-proċedura (filtrazzjoni tal-membrana jew ċentrifugazzjoni) magħżulin għat-trattament tal-kampjun qabel ma jiġi stabbilit il-karbonju (paragrafi 25 u 26). Qabel il-kampjunar, ara li l-midjum tat-test ikun imħallat sew u li kwalunkwe materjal imqabbad ma' ġewwa tal-flask jinħall jew jiġi sospiż.

24. Iffiltra bil-membrana jew iċċentrifuga minnufih wara l-kampjunar. Jekk ikun hemm bżonn, aħżen il-kampjuni ffiltrati jew iċċentrifugati f'2-4 °C sa 48 siegħa jew inqas -18 °C għal perjodi itwal (jekk ikun magħruf li s-sustanza mhux ser tiġi affettwata, aċidifikaha sa pH 2 qabel taħżinha).

25. Il-filtri tal-membrana (0,2-0,45 μm) huma xierqa jekk ikun żgurat li la jeħilsu karbonju u lanqas ma jassorbu s-sustanza fl-istadju tal-filtrazzjoni, eż. filtri tal-membrana tal-polikarbonat. Ċerti filtri tal-membrana huma mxappin b'aġenti tensjoattivi għal idrofilizzazzjoni u jistgħu jeħilsu kwantitajiet konsiderevoli ta' karbonju dissolt. Ħejji t-tali filtri billi tgħallihom f'ilma dejonizzat għal tliet perjodi ta' siegħa konsekuttivi. Wara li tgħallihom, aħżen il-filtri f'ilma dejonizzat. Armi l-ewwel 20 ml tal-filtrat.

26. Minflok filtrazzjoni tal-membrana tista' tingħażel ċentrifugazzjoni tal-kampjuni. Iċċentrifuga f'40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) għal 15-il minuta, idealment f'ċentrifigu mkessaħ.

Nota: Donnha ma taħdimx id-differenzazzjoni tal-Karbonju Organiku Totali (TOC) mid-DOC (TOC/DOC) b'ċentrifugrazzjoni f'konċentrazzjonijiet baxxi ħafna, peress li jew jitneħħewx il-batterji kollha, jew jerġa' jiġi dissolt il-karbonju bħala parti mill-plażma batterjali. F'konċentrazzjonijiet ogħla ((> 10 mg C għal kull litri), l-iżball ta' ċentrifugrazzjoni donnu paragunabbilment żgħir.

Frekwenza tal-kampjunar

27. Jekk isiru analiżijiet eżatt wara l-kampjunar, ivvaluta ż-żmien biex isir il-kampjunar li jmiss billi tqis ir-riżultat tad-determinazzjoni analitika.

28. Jekk il-kampjuni jinżammu (paragrafu 24) sabiex jiġu analizzati iktar tard, ħu iktar kampjuni min-numru minimu meħtieġ ta' ħamsa. L-ewwel analizza l-aħħar kampjuni, u permezz ta' għażla "b'lura" skont l-istadji tal-kampjuni xierqa għal analiżi, huwa possibbli li tikseb deskrizzjoni tajba tal-kurva ta' bijodegradazzjoni b'numru relattivament żgħir ta' determinazzjonijiet analitiċi. Jekk ma tkun seħħet ebda degradazzjoni sa tmiem it-test, ma jkun hemm bżonn li jiġi analizzat ebda kampjun ieħor, u f'din is-sitwazzjoni, l-istrateġija "b'lura" tista' tiffranka spejjeż konsiderevoli tal-analiżi.

▼M6

29. Jekk jiġi osservat plateau fuq il-kurva ta' degradazzjoni qabel il-jum 60, temm it-test. Jekk ovvjament id-degradazzjoni bdiet sal-jum 60, iżda għadha ma laħqitx plateau, tawwal l-esperiment għal perjodu itwal.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

30. Irreġistra r-riżultati analitiċi fuq l-iskeda tad-dejta mehmuża (Appendiċi 2), u kkalkola l-valuri tad-degradazzjoni kemm għas-sustanza tat-test kif ukoll dik ta' referenza mill-ekwazzjoni:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

fejn:

D_t degradazzjoni f'DOC perċentwali jew tneħħija tas-sustanza speċifika fiż-żmien t,

C_o bidu tal-konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fil-midjum tat-test,

C_t konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fil-midjum tat-test fiż-żmien t,

$C_{bl(0)}$ bidu tal-konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fl-inbjank,

$C_{bl(t)}$ konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fl-inbjank fiż-żmien t.

31. Iddikjara d-degradazzjoni bħala t-tneħħija tad-DOC perċentwal (degradazzjoni finali) jew tneħħija tas-sustanza speċifika (degradazzjoni primarja) fiż-żmien t. Ikkalkola l-konċentrazzjonijiet tad-DOC sal-eqreb 0,1 mg għal kull litru, u qarreb il-medji tal-valuri D_t sal-eqreb perċentwal sħiħ.

32. Uri kif mexiet id-degradazzjoni fuq grafika f'dijagramma kif muri fil-figura f'"Validità u interpretazzjoni tar-riżultati". Jekk hemm dejta suffiċjenti, ikkalkola mill-kurva l-fażi tad-dewmien (t_L) u ż-żmien sabiex tintlaħaq tneħħija ta' 50 fil-mija minn tmiem il-fażi ta' dewmien (t_{50}).

Rapport tat-test

33. Ir-rapport tat-test irid ikun fih l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

— l-għamla fiżika u, fejn relevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-post u d-deskrizzjoni tas-sit ta' kampjunar; status ta' tniġġis u tan-nutrijenti (għadd tal-kolonja, nitrat, ammonijaka, fosfat jekk xieraq);

— il-karatteristiċi tal-kampjun (data tal-kampjunar, fond, dehra, temperatura, salinità, DOC (mhux bilfors), id-dewmien bejn il-ġbir u l-użu fit-test;

▼M6

— il-metodu użat (jekk jintuża wieħed) sabiex jiqdiem il-baħar;

— il-metodu użat għall-pretrattament (filtrazzjoni/sedimentazzjoni) tal-ilma baħar;

— il-metodu użat għad-determinazzjoni tad-DOC;

— il-metodu użat għall-analiżi speċifika (mhux obbligatorju);

— il-metodu użat għad-determinazzjoni tan-numru ta' eterotrofi fl-ilma baħar (il-metodu tal-għadd tal-pjastrini jew proċedura oħra) (mhux obbligatorju);

— metodi oħrajn (mhux obbligatorji) użati biex jiġi kkaratterizzat l-ilma baħar (kejliet tal-ATP, eċċ.).

Riżultati:

— dejta analitika rrapportata fuq skeda tad-dejta (Appendiċi 2);

— kif mexa t-test tad-degradazzjoni huwa rrappreżentat fuq grafika f'dijagramma li turi l-fażi ta' dewmien (t_L), inklinazzjoni grafika, u żmien (b'bidu minn tmiem il-fażi ta' dewmien) sabiex tinkiseb tneħħija ta' 50 fil-mija (t_{50}). Il-fażi ta' dewmien tista' tiġi stmata fuq grafika kif muri fil-figura fis-sezzjoni "Validità u interpretazzjoni tar-riżultati" jew għal konvenjenza jista' jintuża ż-żmien meħtieġ għal degradazzjoni ta' 10 fil-mija;

— id-degradazzjoni f'perċentwali mkejla wara 60 jum, jew fi tmiem it-test.

Diskussjoni tar-riżultati.

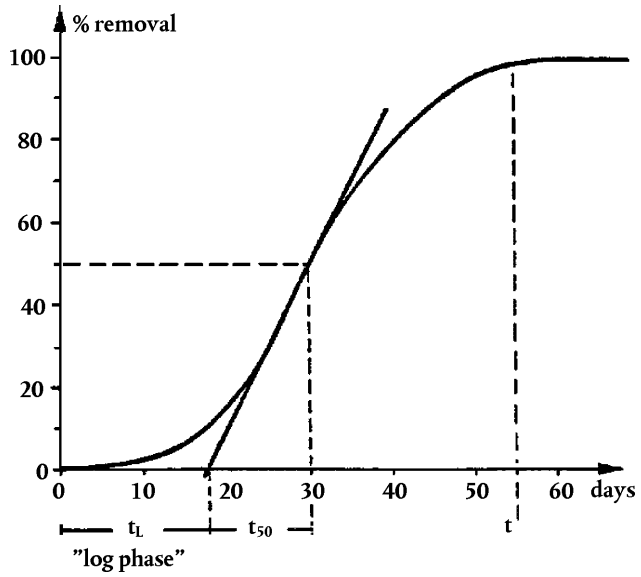
Validità u interpretazzjoni tar-riżultati

34. Ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza eż. benżoat tas-sodju, aċetat tas-sodju jew anilina, għandhom ikunu paragunabbli mar-riżultati miksubin fir-ringtest (3) (irreferi għas-sezzjoni dwar is-"Sustanzi ta' referenza", paragrafu 7). Jekk ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza ma jkunux tipiċi, it-test għandu jerġa' jsir bl-użu ta' kampjun ieħor ta' ilma baħar. Għad li r-riżultati tat-testijiet ta' inibizzjoni mhux dejjem ikun faċli tinterpretahom minħabba l-kontribuzzjoni tad-DOC mis-sustanza tat-test, tnaqqis kbir fir-rata ta' tneħħija tad-DOC totali, meta mqabbla ma' dik tal-kontroll, huwa sinjal pożittiv ta' effetti tossiċi.

35. Minħabba l-konċentrazzjonijiet tat-test relattivament għoljin użati meta mqabblin ma' ħafna sistemi naturali (u konsegwentement proporzjon mhux favorevoli bejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test u sorsi oħrajn tal-karbonju), il-metodu għandu jitqies bħala test preliminari li jista' jintuża biex jindika jekk sustanza hijiex faċilment bijodegradabbli. Għalhekk, riżultat baxx mhux bilfors ifisser li s-sustanza tat-test mhijiex bijodegradazzjoni f'ambjenti marittimi, iżda jindika li hemm bżonn isir iktar xogħol sabiex jiġi stabbilit jekk dan huwiex minnu.

Eżempju ta' esperiment ta' degradazzjoni teoriku li juri mod fattibbli ta' kif jistgħu jiġu stmati l-valuri ta' t_L (tul tal-"fażi ta' dewmien") u t_{50} (intervall taż-żmien, li jibda f't_L), meħtieġ sabiex tinkiseb tneħħija ta' 50 fil-mija, huwa mogħti fil-figura ta' hawn taħt.

▼M6



METODU TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu huwa varjant tal-ilma baħar tat-Test tal-Flixkun Magħluq (5) u ġie ffinalizzat wara ringtest organizzat għall-Kummissjoni Ewropea (KE) mill-Istitut Daniż għall-Kwalità tal-Ilma (3).

2. B'mod simili għall-Metodu tal-Flask Mheżżeż, ir-riżultati ta' dan it-test ma għandhomx jitqiesu bħala indikazzjonijiet ta' bijodegradabilità pronta, iżda għandhom jintużaw b'mod speċifiku sabiex tinkiseb informazzjoni dwar il-bijodegradabilità tas-sustanzi f'ambjenti marittimi.

PRINĊIPJU TAL-METODU

3. Ammont prestabbilit tas-sustanza tat-test jiġi dissolt fil-midjum tat-test f'konċentrazzjoni ta', normalment, 2-10 mg tas-sustanza tat-test għal kull litru (tista' tintuża konċentrazzjoni waħda jew iktar). Is-soluzzjoni tinżamm fi flixkin magħluq fid-dlam f'banju ta' temperatura kostanti jew f'post magħluq ikkontrollat sa ± 1 °C fi ħdan medda ta' 15-20 °C. F'dawk il-każijiet li fihom l-objettiv tal-istudju huwa li jissimula sitwazzjonijiet ambjentali, jistgħu jitwettqu testijiet lil hinn minn din il-medda ta' temperatura normali diment li jsiru aġġustamenti xierqa għall-kontroll tat-temperatura. Id-degradazzjoni hija segwita minn analiżijiet tal-ossiġenu tul perjodu ta' 28 jum.

4. Ir-ringtest wera li jekk it-test ġie estiż lil hinn minn 28 jum, ma tista' tinġabar ebda informazzjoni siewja f'ħafna każijiet, minħabba xkiel serju. Il-valuri inbjank tad-domanda bijoloġika ta' ossiġenu (BOD) kienu għoljin wisq, aktarx minħabba tkabbir man-naħa ta' ġewwa tal-flask, ikkaġunat minn nuqqas ta' tħawwid, u nitrifikazzjoni. B'hekk, id-durata rrakkomandata hija ta' 28 jum, iżda jekk il-valur inbjank tal-BOD jibqa' fi ħdan il-limitu ta' 30 fil-mija (paragrafi 15 u 40), it-test jista' jittawwal.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

5. Sabiex ikun magħruf jekk it-test jistax jiġi applikat għal sustanza partikolari, iridu jkunu magħrufin uħud mill-karatteristiċi tagħha. Il-formula empirika hija meħtieġa sabiex tkun tista' tiġi kkalkolata d-domanda teorika ta' ossiġenu (ThOD) (ara l-Appendiċi 3); inkella, tkun trid tiġi stabbilita d-domanda kimika ta' ossiġenu (COD) tas-sustanza sabiex isservi bħala l-valur referenzjarju. L-użu tas-COD huwa inqas sodisfaċenti peress li ċerti sustanzi mhumiex kompletament ossidizzati fit-test tas-COD.

▼M6

6. Is-solubilità tas-sustanza għandha tkun tal-inqas ta' 2 mg/l, għad li fil-prinċipju jistgħu jiġu ttestjati sustanzi inqas solubbli (eż. bl-użu ta' ultrasonifikazzjoni) u hekk ukoll sustanzi volatili. Informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet relattivi tal-komponenti l-kbar tas-sustanza tat-test hija meħtieġa sabiex ikunu jistgħu jiġu interpretati r-riżultati miksubin, speċjalment meta r-riżultat ikun qrib il-livell ta' "suċċess".

7. Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza għall-batterji, eż. kif imkejla fit-testijiet ta' respirazzjoni fuq terminu qasir (4) tista' tkun ferm siewja meta jingħażlu konċentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista' tkun essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri baxxi ta' bijodegradazzjoni. Madankollu, it-tali informazzjoni mhijiex dejjem biżżejjed sabiex jiġu interpretati r-riżultati miksubin fit-test ta' bijodegradazzjoni u l-proċedura deskritta fil-paragrafu 27 hija iktar adattata.

SUSTANZI TA' REFERENZA

8. Iridu jintużaw sustanzi ta' referenza adattati sabiex tiġi vverifikata l-attività mikrobjali tal-kampjun ta' ilma baħar. Għal dan il-għan jistgħu jintużaw anilina, aċetat tas-sodju jew benżoat tas-sodju (pereżempju). Trid isseħħ degradazzjoni ta' dawn is-sustanzi ta' tal-inqas 60 fil-mija (tat-ThOD tagħhom) fi ħdan perjodu raġonevolment qasir, inkella huwa rrakkomandat li t-test jerġa' jsir billi jintuża kampjun ieħor tal-ilma baħar.

9. Fir-ringtest tal-KE, li fih il-kampjuni ta' ilma baħar ittieħdu minn postijiet differenti u fi żminijiet differenti tas-sena, il-fażi ta' dewmien (t_L) u ż-żmien sakemm tinkiseb degradazzjoni ta' 50 fil-mija (t_{50}), eskluża l-fażi tad-dewmien, kienu ta' 0 sa jumejn u jum sa 4 rispettivament għall-benżoat tas-sodju. Għall-anilina, il-valuri ta' t_L u t_{50} kienu ta' 0 sa 7 u jumejn sa 12-il jum rispettivament.

RIPRODUĊIBILITÀ

10. Ir-riproduċibilità tal-metodi ġiet stabbilita fir-ringtest tal-KE (3).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

11. Tagħmir normali tal-laboratorju u:

(a) jistgħu jintużaw fliexken tal-BOD tal-250-300 ml b'tappijiet tal-ħġieġ jew flixkun b'għonq dejjaq tal-250 ml b'tappijiet tal-ħġieġ;

(b) Bosta fliexken taż-2, it-3 u l-4 litri b'marki tal-litri għat-tħejjija tal-esperiment u għall-mili tal-fliexken tal-BOD;

(c) Banjumarija jew kamra b'temperatura kostanti għaż-żamma tal-fliexken f'temperatura kostanti (± 1 °C) bl-esklużjoni tad-dawl.

(d) Tagħmir għall-analiżi tal-ossiġenu dissolt;

(e) Filtri tal-membrana, 0,2-0,45 μm (mhux obbligatorji);

(f) Tagħmir għal analiżi speċifika (mhux obbligatorju).

Ilma baħar

12. Ħu kampjun ta' ilma baħar f'kontenitur maħsul sew u ħudu fil-laboratorju, idealment fi żmien jum jew tnejn mit-teħid. Matul it-trasportar, tħallix it-temperatura tal-kampjun taqbeż wisq it-temperatura li ser tintuża fit-test.

▼M6

13. Identifika l-post tal-kampunar bi preċiżjoni u ddeskrivih f'termini tal-istatus ta' tniġġis u nutrizzjonali tiegħu. B'mod partikolari għal ilmijiet tal-kosta jew imniġġsin, f'din il-karatterizzazzjoni għandek tinkludi għadd tal-kolonja mikrobjali eterotrofika u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet ta' nitrat, ammonijaka u fosfat dissolti.

14. Ipprovdi l-informazzjoni li ġejja għall-kampjun ta' ilma baħar stess:

— id-data tat-teħid;

— il-fond tat-teħid;

— id-dehra tal-kampjun — imċajpar eċċ.;

— it-temperatura fil-ħin tat-teħid;

— is-salinità;

— il-karbonju organiku dissolt (DOC);

— id-dewmien bejn it-teħid u l-użu fit-test.

15. Jekk jinstab li l-kontenut tad-DOC tal-kampjun huwa għoli jew jekk huwa maħsub li l-BOD inbjank wara 28 jum għandha tkun iktar minn 30 fil-mija ta' dik tas-sustanzi ta' referenza, huwa rrakkomandat li l-ilma baħar jitħalla jiqdiem għal madwar ġimgħa qabel jintuża.

16. Ħalli l-kampjun jiqdiem billi taħżnu f'kundizzjonijiet aerobiċi fit-temperatura tat-test u fid-dlam jew f'dawl bati. Jekk hemm bżonn, żomm il-kundizzjonijiet aerobiċi billi tagħtih ftit arja. Meta jkun qed jiqdiem, jonqos il-kontenut ta' materjal organiku faċilment degradabbli. Fir-ringtest (3), ma nstabet ebda differenza bejn il-potenzjal ta' degradazzjoni tal-kampjun ta' ilma baħar li tħalla jiqdiem u dak ta' ilma baħar miġbur frisk.

17. Qabel tużah, ittratta l-ilma baħar minn qabel sabiex tneħħi l-partikoli ħorox, eż. permezz ta' filtrazzjoni minn filtru tan-najlon jew karta filtru ħarxa (mhux filtri tal-GF-C jew membrana), jew permezz ta' sedimentazzjoni u dekantar. Irrapporta l-proċedura użata. Ittrattah minn qabel wara li jiqdiem, jekk jintuża.

Soluzzjonijiet ewlenin għal nutrijenti minerali

18. Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin li ġejjin bl-użu ta' reaġenti tal-grad analitiku:

(a)	Potassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4	8,50 g
	Dipotassju idroġenu ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Disodju idroġenu ortofosfat diidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Klorid tal-ammonium, NH_4Cl	0,50 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	
(b)	Klorur tal-kalċju, $CaCl_2$	27,50 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	
(c)	Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	
(d)	Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	

▼M6

Preċipitazzjoni fis-soluzzjoni (d) tista' tiġi evitata billi tiżdied qatra ta' HCl ikkonċentrat jew 0,4 g etilenedjaminetetra-aċidu aċetiku (EDTA, melħ disodju) għal kull litru. Jekk jifforma preċipitat f'soluzzjoni ewlenija, ibdilha ma' soluzzjoni magħmula ġdida.

Tħejjija tal-midjum tat-test

19. Għal kull litru ilma baħar pretrattat, żid 1 ml ta' kull waħda mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' hawn fuq. Issatura l-midjum tat-test b'arja fit-temperatura tat-test billi tagħtih l-arja b'arja kkompressata nadifa għal madwar 20 minuta. Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għal skopijiet ta' kontroll. Il-konċentrazzjoni saturata ta' ossiġenu dissolt bħala funzjoni tas-salinità u t-temperatura tista' tinqara min-nomogramma inkorporata ma' dan il-metodu ta' ttestjar (Appendiċi 4).

Inokulu

20. Iżżidx inokulu speċifiku minbarra l-mikroorganiżmi diġà preżenti fl-ilma baħar. Iddetermina (mhux bilfors) in-numru ta' eterotrofi li jifformaw kolonja fil-midjum tat-test ta' ilma baħar (u idealment anki fil-kampjun ta' ilma baħar oriġinali), eż. bl-għadd tal-pjastrini bl-użu ta' agar marittimu. Dan ikun ideali b'mod partikolari għal kampjuni minn siti kostali jew imniġġsin. Ivverifika l-attività mikrobjali eterotrofika fl-ilma baħar billi tagħmel test b'sustanza ta' referenza.

Tħejjija tal-fliexken tat-test

21. Agħmel il-manipolazzjonijiet meħtieġa kollha inkluż li tħalli l-ilma baħar jiqdiem u tittrattah minn qabel fit-temperatura magħżula tat-test ta' bejn 15 u 20 °C, filwaqt li tiżgura li jkun hemm indafa, iżda mhux sterilità tal-oġġetti kollha tal-ħġieġ.

22. Ħejji l-gruppi ta' fliexken tal-BOD sabiex issib il-BOD tat-test u s-sustanzi ta' referenza f'sensiela sperimentali simultanja. Agħmel l-analiżijiet kollha fuq fliexken ta' duplikati (sustanzi inbjank, ta' referenza u tat-test), jiġifieri ħejji żewġ fliexken għal kull determinazzjoni. Agħmel analiżijiet tal-inqas fil-jiem 0, 5, 15 u 28 (erba' determinazzjonijiet). Għal analiżijiet tal-ossiġenu, erba' determinazzjonijiet jeħtieġu total ta' 3 x 2 x 4 = 24 flixkun (sustanzi inbjank, ta' referenza u tat-test), u b'hekk madwar 8 litri tal-midjum tat-test (għal konċentrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test).

23. Ħejji soluzzjonijiet separati tas-sustanzi tat-test u ta' referenza fi fliexken kbar ta' volum suffiċjenti (paragrafu 11) billi l-ewwel iżżid is-sustanzi tat-test u ta' referenza jew direttament jew billi tuża soluzzjoni ewlenija konċentrata fil-fliexken il-kbar mimlijin f'parti minnhom. Żid midjum tat-test ieħor sabiex tagħti l-konċentrazzjonijiet finali mixtieqa. Jekk jintużaw is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanzi tat-test u/jew ta' referenza, ara li s-salinità tal-midjum tal-ilma baħar ma tinbidilx wisq.

24. Agħżel konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test u ta' referenza billi tieħu f'kunsiderazzjoni:

(a) is-solubilità tal-ossiġenu dissolt fl-ilma baħar fit-temperatura u s-salinità prevalenti tat-test (ara n-nomogramma inkorporata — Appendiċi 4);

(b) il-BOD inbjank tal-ilma baħar; u

(c) il-bijodegradabilità mistennija tas-sustanza tat-test.

▼M6

25. Fi 15 °C u 20 °C u salinità ta' 32 parti għal kull elf (ilma tal-oċean), is-solubilità tal-ossiġenu dissolt hija ta' madwar 8,1 u 7,4 mg/l rispettivament. Il-konsum tal-ossiġenu tal-ilma baħar stess (respirazzjoni inbjank) jista' jkun ta' 2 mg O_2/l jew iktar, jekk l-ilma baħar ma jitħalliex jiqdiem. Għaldaqstant, sabiex tiżgura li jkun fadal konċentrazzjoni sinifikanti ta' ossiġenu wara l-ossidazzjoni tas-sustanza tat-test, uża konċentrazzjoni tal-bidu tas-sustanza tat-test ta' madwar 2-3 mg/l (skont it-ThOD) għas-sustanzi li huma mistennijin jiġu degradati bis-sħiħ fil-kundizzjonijiet tat-test (bħal sustanzi ta' referenza). Ittestja sustanzi inqas degradabbli f'konċentrazzjonijiet ogħla, sa madwar 10 mg/l, diment li ma jseħħux effetti tossiċi. Jista' jkun ta' vantaġġ li jsiru testijiet paralleli b'konċentrazzjoni baxxa (madwar 2 mg/l) u għolja (madwar 10 mg/l) tas-sustanza tat-test.

26. Irid jiġi stabbilit inbjank tal-ossiġenu b'mod parallel fi fliexken li la fih sustanza tat-test u lanqas ta' referenza.

27. Jekk iridu jiġu stabbiliti effetti inibitorji, ħejji s-sensiela li ġejja ta' soluzzjonijiet fi fliexken kbar separati (paragrafu 13):

(a) 2 mg għal kull litru ta' sustanza faċilment degradabbli, eż. kwalunkwe waħda mis-sustanzi ta' referenza msemmijin;

(b) x mg għal kull litru tas-sustanza tat-test (normalment x huwa 2);

(c) 2 mg għal kull litru tas-sustanza faċilment degradabbli flimkien ma' x mg għal kull litru tas-sustanza tat-test.

Test tal-kontroll fiżikokimiku (mhux obbligatorju)

28. Jekk tintuża l-possibbiltà li jintużaw analiżijiet speċifiċi, jista' jsir esperiment fiżikokimiku sabiex jiġi vverifikat jekk is-sustanza tat-test titneħħa permezz ta' mekkaniżmi abijotiċi, bħal idroliżi jew assorbiment. Test tal-kontroll fiżikokimiku jista' jsir billi jiżdied klorur tal-merkurju (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) fi flasks ta' duplikati b'sustanza tat-test sabiex titwaqqaf l-attività mikrobjali. Tnaqqis sinifikanti fil-konċentrazzjoni tas-sustanza speċifika matul it-test jindika mekkaniżmi ta' tneħħija abijotiċi.

Numru ta' fliexken tal-BOD f'testijiet tipiċi

29. F'testijiet tipiċi jintużaw il-fliexken li ġejjin:

— tal-inqas 8 li fihom is-sustanza tat-test;

— tal-inqas 8 li fihom ilma baħar miżjud bin-nutrijenti biss;

— tal-inqas 8 li fihom is-sustanza ta' referenza, u meta jkun hemm bżonn

— 6 fliexken li fihom is-sustanzia tat-test u ta' referenza (kontroll tat-tossiċità).

PROĊEDURA

30. Wara t-tħejjija, battal kull soluzzjoni minnufih, mill-kompartiment inferjuri (mhux mill-qiegħ) tal-flixkun il-kbir xieraq, biex timla l-grupp rispettiv tal-fliexken tal-BOD. Minnufih għandek tanalizza l-kontrolli żero (żmien żero) għal ossiġenu dissolt (paragrafu 33) jew żommhom għal analiżi kimika iktar tard permezz ta' preċipitazzjoni b'$MnCl_2$ (klroru tal-manjeżju (II)) u NaOH (idrossidu tas-sodju).

([1]) Klorur tal-merkurju (II) ($HgCl_2$) huwa sustanza ferm tossika li għandha titqandel bil-prekawzjonijiet xierqa. Skart milwiem li fih din is-sustanza kimika għandu jintrema kif xieraq; ma għandux jintrema direttament fis-sistema ta' ilma mormi.

▼M6

31. Inkuba l-fliexken paralleli tal-BOD li jifdal fit-temperatura tat-test (15-20 °C), żommhom fid-dlam, u neħħihom miż-żona ta' inkubazzjoni f'intervalli xierqa ta' ħin (eż. tal-inqas wara 5, 15 u 28 jum) u analizzahom għal ossiġenu dissolt (paragrafu 33).

32. Filtru tal-membrana (0,2-0,45 μm) jew iċċentrifuga, għal 15-il minuta, il-kampjuni għal analiżijiet speċifiċi (mhux obbligatorji). Aħżinhom għal 48 siegħa f'2-4 °C, jew għal perjodi itwal fi -18 °C, jekk mhux analizzati minnufih (jekk mhuwiex magħruf li s-sustanza tat-test mhix ser tkun affettwata, aċidifika għal pH 2 qabel ma taħżinhom).

Determinazzjoni tal-ossiġenu dissolt

33. Iddetermina l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt billi tuża metodu kimiku jew elettrokimiku li huwa rikonoxxut f'livell nazzjonali jew internazzjonali.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-Riżultati

34. Irreġistra r-riżultati analitiċi fuq l-iskedi ta' dejta mehmużin (Appendiċi 5).

35. Ikkalkola l-BOD bħala d-differenza tat-tnaqqis tal-ossiġenu bejn inbjank u soluzzjoni tas-sustanza tat-test fil-kundizzjonijiet tat-test. Aqsam it-tnaqqis tal-ossiġenu nett bil-konċentrazzjoni (w/v) tas-sustanza sabiex tesprimi l-BOD bħala mg BOD/mg sustanza tat-test. Id-degradazzjoni hija ddefinita bħala l-proporzjon tad-domanda bijokimika ta' ossiġenu, idealment, meta mqabbla mad-domanda teorika ta' ossiġenu (ThOD) jew id-domanda kimika ta' ossiġenu (COD) u mogħtija bħala perċentwal (ara l-paragrafu 36).

36. Ikkalkola l-valuri ta' bijodegradazzjoni għal kull żmien ta' kampjunar kemm għas-sustanza tat-test u ta' referenza billi tuża waħda mill-ekwazzjonijiet:

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mgtested\ substance}{mg\ ThOD/mgtested\ substance} \times 100$$

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mgtested\ substance}{mg\ COD/mgtested\ substance} \times 100$$

fejn:

ThOD = domanda teorika ta' ossiġenu (kalkolu, Appendiċi 3)

COD = domanda kimika ta' ossiġenu, iddeterminata b'mod sperimentali.

Nota: Kultant, iż-żewġ modi ta' kalkolu (perċentwal tat-ThOD jew perċentwal tas-COD) ma jagħtux l-istess riżultati; huwa ppreferut l-użu tat-ThOD, peress li whud mis-sustanzi mhumiex kompletament ossidizzati fit-test tas-COD.

37. Uri kif mexa t-test ta' degradazzjoni fuq grafika f'dijagramma (ara l-eżempju fis-sezzjoni dwar "Validità u interpretazzjoni tar-riżultati". Jekk hemm biżżejjed dejta, ikkalkola l-fażi ta' dewmien (t_L) u ż-żmien (t_{50}) sabiex tintlaħaq tneħħija ta' 50 fil-mija minn tmiem il-fażi ta' dewmien mill-kurva ta' bijodegradazzjoni.

38. Jekk tintuża analiżi speċifika (mhux bilfors), iddikjara l-perċentwal tad-degradazzjoni primarja bħala l-perċentwal tat-tneħħija ta' sustanza speċifika fi ħdan il-perjodu tat-test (ikkoreġi għal inbjanki analitiċi).

▼M6

Rapport tat-Test

39. Ir-rapport tat-test irid ikun fih l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

— l-għamla fiżika u, fejn relevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-post u d-deskrizzjoni tas-sit tal-kampjunar: status ta' tniġġis u nutrizzjonali (għadd tal-kolonja, nitrat, ammonijaka, fosfat jekk xieraq);

— il-karatteristiċi tal-kampjun (data tal-kampjunar, fond, dehra, temperatura, salinità, DOC (mhux bilfors), dewmien bejn it-teħid u l-użu fit-test);

— il-metodu użat (jekk intuża wieħed) sabiex jiqdiem l-ilma baħar;

— il-metodu użat għall-pretrattament (filtrazzjoni/sedimentazzjoni) tal-ilma baħar;

— il-metodu użat għad-determinazzjoni tas-COD (jekk issir);

— il-metodu użat għall-kejliet tal-ossiġenu;

— il-proċedura ta' dispersjoni għas-sustanzi li ftit li xejn huma solubbli fil-kundizzjonijiet tat-test;

— il-metodu użat sabiex jiġi stabbilit in-numru ta' eterotrofi fl-ilma baħar (il-metodu ta' għadd tal-pjastrini jew proċedura oħra);

— il-metodu użat għad-determinazzjoni tad-DOC fl-ilma baħar (mhux bilfors);

— il-metodu użat għal analiżi speċifika (mhux bilfors);

— metodi mhux obbligatorji oħrajn użati sabiex jiġi kkaratterizzat l-ilma baħar (kejliet tal-ATP, eċċ.).

Riżultati:

— dejta analitika rrapportata fuq skeda ta' dejta (kif meħmuża, Appendiċi 5);

— matul it-test ta' degradazzjoni rrappreżentat fuq grafika f'dijagramma li turi l-fażi ta' dewmien, (t_L), l-inklinazzjoni grafika u ż-żmien (b'bidu minn tmiem il-fażi ta' dewmien) sakemm jintlaħaq teħid ta' 50 fil-mija tat-teħid ta' ossiġenu finali b'ossidazzjoni tas-sustanza tat-test (t_{50}). Il-fażi ta' dewmien tista' tiġi stmata fuq grafika kif muri fil-figura meħmuża, jew għal konvenjenza tittieħed bħala ż-żmien meħtieġ għal degradazzjoni ta' 10 fil-mija;

— id-degradazzjoni perċentwali mkejla wara 28 jum.

Diskussjoni tar-riżultati

Validità u interpretazzjoni tar-riżultati

40. Ir-respirazzjoni inbjank ma għandhiex taqbeż it-30 fil-mija tal-ossiġenu fil-flixkun tat-test. Jekk ma jkunx possibbli li jiġi ssodisfat dan il-kriterju bl-użu ta' ilma baħar meħud frisk, l-ilma baħar irid jitħalla jiqdiem (jistabbilizza) qabel jintuża.

41. Trid tiġi kkunsidrata l-possibbiltà li sustanzi li fihom nitroġenu jaffettwaw ir-riżultati.

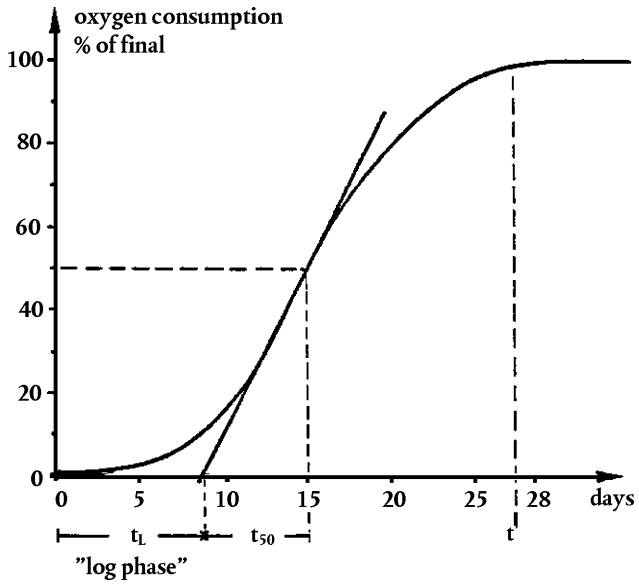
▼M6

42. Ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza benżoat tas-sodju u anilina għandhom ikunu paragunabbli mar-riżultati miksubin fir-ringtest (3) (paragrafu 9). Jekk ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza jkunu atipiċi, it-test għandu jerġa' jsir bl-użu ta' kampjun ieħor ta' ilma baħar.

43. Is-sustanza tat-test tista' titqies li hija inibitorja għall-batterji (fil-konċentrazzjoni użata) jekk il-BOD tat-taħlita tas-sustanza ta' referenza u dik tat-test tkun inqas mis-somma tal-BOD tas-soluzzjonijiet separati taż-żewġ soluzzjonijiet.

44. Minħabba l-konċentrazzjonijiet tat-test relattivament għoljin meta mqabblin ma' ħafna mis-sistemi naturali, u konsegwentement minħabba proporzjon favorevoli bejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u sorsi tal-karbonju oħrajn, il-metodu għandu jitqies bħala test preliminari li jista' jintuża sabiex jiġi indikat jekk sustanza hijiex faċilment bijodegradabbli jew le. Għalhekk, riżultat baxx mhux bilfors ifisser li s-sustanza tat-test mhijiex bijodegradazzjoni f'ambjenti marittimi, iżda jindika li hemm bżonn isir iktar xogħol sabiex jiġi stabbilit jekk dan huwiex minnu.

Eżempju ta' esperiment teoriku ta' degradazzjoni li juri mod fattibbli kif jiġu stmati l-valuri ta' t_L (tul tal-"fażi ta' dewmien") u t_{50}, l-intervall taż-żmien (b'bidu minn tL), meħtieġ sabiex jintlaħaq teħid finali ta' 50 % tal-ossiġenu kkaġunat minn ossidazzjoni tas-sustanza tat-test, jingħata hawn taħt:



LETTERATURA

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Il-Kapitolu C.4-B ta' dan l-Anness: Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità "Lesta" Parti III Test ta' Tgħarbil tal-OECD Immodifikat

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.

(4) Il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness: Bijodegradazzjoni — Ħama Attivata, Test tal-Inibizzjoni tat-Teħid tan-Nifs.

(5) Il-Kapitolu C.4-D ta' dan l-Anness: Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità "Lesta" Parti VI. Test tal-Flixkun Magħluq.

▼M6

Appendiċi 1

Determinazzjoni tal-karbonju organiku fl-ilma baħar

METODU TAL-FLASK MHEŻŻEŻ

Għad-determinazzjoni tal-karbonju organiku ta' kampjun ta' ilma, il-komposti organiċi fil-kampjun huma ossidizzati għal dijossidu tal-karbonju, ġeneralment bl-użu ta' waħda mit-tliet tekniki li ġejjin:

— ossidazzjoni mxarrba b'persulfat/irradjazzjoni tal-UV;

— ossidazzjoni mxarrba b'persulfat/temperatura għolja (116-130 °C);

— kombustjoni.

CO_2 evolut huwa kkwantifikat billi titħaddem titrimetrija jew spettrometrija infraħamra. Inkella, CO_2 jitnaqqas għal metan, li huwa kkwantifikat fuq detettur tal-jonizzazzjoni tal-fjamma (FID).

Il-persulfat/metodu tal-UV jintuża spiss għall-analiżi tal-ilma "nadif" b'kontenut baxx ta' materja partikolata. L-aħħar żewġ metodi jistgħu jiġu applikati għal ħafna mit-tipi ta' kampjuni ta' ilma, il-persulfat/l-ossidizzazzjoni tat-temperatura għolja li huma l-iktar xierqa għal kampjuni b'livell baxx, u t-teknika ta' kombustjoni li tapplika għal kampjuni b'kontenut ta' karbonju organiku mhux volatili (NVOC) ferm ogħla minn 1 mg C/l.

Interferenzi

It-tliet metodi kollha kemm huma jiddependu mill-eliminazzjoni jew il-kumpens għal karbonju inorganiku (IC) preżenti fil-kampjun. It-tneħħija tas-CO_2 mill-kampjun aċidifikat huwa l-iktar metodu użat spiss biex jiġi eliminat l-IC, għad li dan jirriżulta wkoll f'telf ta' komposti oraniċi volatili (1). It-tneħħija sħiħa jew il-kumpens tal-IC iridu jiġu żgurati għal kull matriċi tal-kampjun, u karbonju organiku volatili (VOC) irid jiġi stabbilit minbarra l-NVOC li jiddependi mit-tip ta' kampjun.

Konċentrazzjonijiet għoljun ta' klorur jirriżultaw f'effiċjenza mnaqqsa ta' ossidizzazzjoni bl-użu ta' persulfat/metodu tal-UV (2). Madankollu, l-applikazzjoni ta' reaġent ta' ossidizzazzjoni mmodifikat biż-żieda tan-nitrat tal-merkurju (II) tista' tneħħi din l-interferenza. Huwa rrakkomandat li l-volum massimu tollerabbli tal-kampjun jintuża sabiex jiġi evalwat kull tip ta' kampjun li fih il-klorur. Konċentrazzjonijiet għoljin ta' melħ fil-kampjun analizzati bl-użu tal-metodu ta' kombustjoni jistgħu jikkaġunaw kisi bil-melħ tal-katalist u korrożjoni eċċessiva tat-tubu ta' kombustjoni. Għandhom jittieħdu prekawzjonijiet skont il-manwal tal-manifattur.

Kampjuni ferm imċajprin kif ukoll kampjuni li fihom materja partikolata jistgħu jiġu ossidizzati mhux b'mod totali meta jitħaddem il-persulfat/metodu tal-UV.

Eżempju ta' metodu xieraq

Karbonju organiku mhux volatili huwa stabbilit permezz ta' ossidizzazzjoni b'persulfat/irradjazzjoni tal-uv u kwantifikazzjoni sussegwenti tas-CO_2 evolut bl-użu ta' spettrometrija infraħamra mhux dispersiva.

Ir-reaġent ta' ossidizzazzjoni huwa mmodifikat skont is-suġġerimenti mogħtijin f'(2) kif deskritt fil-manwal tal-manifattur:

a) 8,2 g $HgCl_2$ u 9,6 g $Hg(NO_3)_2$ H_2O huma dissolti f'diversi mijiet ta' millilitri ta' ilma reaġent b'konċentrazzjoni baxxa tal-karbonju.

b) 20 g $K_2S_2O_8$ huma dissolti fis-soluzzjoni ta' melħ merkuriku.

▼M6

c) 5 ml HNO_3 (konċ.) jiżdiedu mat-taħlita.

d) ir-reaġent jiġi dilwit għal 1 000 ml.

L-interferenza mill-klorur jitneħħa bl-użu ta' volum tal-kampjun ta' 40 µl għal 10 fil-mija klorur u volum tal-kampjun ta' 200 µl għal 1,9 fil-mija klorur. Kampjuni ta' konċentrazzjonijiet għoljin ta' klorur u/jew volumi ikbar tal-kampjun jistgħu jiġu analizzati skont dan il-metodu diment li tiġi evitata akkumulazzjoni tal-klorur fir-reċipjent ta' ossidazzjoni. Imbagħad jista' jiġi stabbilit il-karbonju organiku volatili, jekk relevanti, għat-tip ta' kampjun inkwistjoni.

LETTERATURA

(1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Ta' interess ukoll (jiddeskrivi sistema ta' awtoanaliżi):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼M6

Appendiċi 2

Bijodegradazzjoni fl-ilma baħar

METODU TA' FLASK MHEŻŻEŻ

SKEDA TAD-DEJTA

1. **LABORATORJU:**

2. **DATA FIL-BIDU TAT-TEST:**

3. **SUSTANZA TAT-TEST:**

Isem:

Konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija: mg/l bħala sustanza

Konċentrazzjoni inizjali fil-midjum, t_o: mg/l bħala sustanza

mg DOC/l

4. **ILMA BAĦAR:**

Is-sors:

Id-data tat-teħid:

Il-fond tat-teħid:

Id-dehra f'ħin it-teħid (eż. imċajpar, eċċ.):

Is-salinità fit-teħid: ‰

It-temperatura fit-teħid: °C

Id-DOC "x" sigħat wara t-teħid: mg/l

Il-pretrattament qabel l-ittestjar (eż. filtrazzjoni, sedimentazzjoni, żmien kemm ħalla jiqdiem, eċċ.):

L-għadd tal-kolonja mikrobjali — kampjun oriġinali: kolonji/ml

— fil-bidu tat-test: kolonji/ml

Karatteristiċi oħrajn:

5. **DETERMINAZZJONIJIET TAL-KARBONJU:**

Analizzatur tal-karbonju:

	Nru tal-flask		DOC wara n jiem (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: ilma baħar miżjud bin-nutrijenti bis-sustanza tat-test	1	a_1					
		a_2					
		medja, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		medja, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Nru tal-flask		DOC wara n jiem (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Inbjank: ilma baħar miżjud bin-nutrijenti mingħajr is-sustanza tat-test	1	c_1					
		c_2					
		medja, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		medja, $C_{d(t)}$					
	medja,$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALWAZZJONI TAD-DEJTA MHUX IPPROĊESSATA:**

Nru tal-Flask	Kalkolu tar-riżultati	% Degradazzjoni wara n jiem				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Medja (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Ma għandhiex tingħata l-medja ta' D_1 u D_2 jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: Jistgħu jintużaw formats simili meta d-degradazzjoni tkun segwita minn analiżi speċifika u għas-sustanza ta' referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **DEGRADAZZJONI ABIJOTIKA (mhux obbligatorja)**

	Żmien (jiem)	
	0	t
Konċ. tad-DOC (mg/l) fil-kontroll sterili	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \ abiotic \ degradation = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Appendiċi 3

Kalkolu tad-domanda teorika bijokimika ta' ossiġenu

METODU TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ

It-ThOD tas-sustanza $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ tal-piż molekolari MW hija kkalkolata skont:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Dan il-kalkolu jimplika li C huwa mineralizzat għal CO_2, H sa H_2O, P sa P_2O_5 u Na to Na_2O. L-aloġenu huwa eliminat bħala aloġenur tal-idroġenu u nitroġenu bħala ammobijaka.

Eżempju:

Glukożju $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mg\ glucose$$

Il-piżijiet molekolari tal-melħiet għajr dawk tal-metalli alkali huma kkalkolati fuq is-suppożizzjoni li l-melħiet ġew idrolizzati.

Il-kubrit huwa supponut li huwa ossidizzat għall-istat ta' + 6.

Eżempju:

Sodium n-dodecylbenzenesulphonate $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mg\ substance$$

Fil-każ ta' sustanzi li fihom nitroġenu, in-nitroġenu jista' jiġi eliminat bħala ammonijaka, nitrit, jew nitrat li jikkorrispondi għal domandi bijokimiċi teoriċi differenti ta' ossiġenu.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

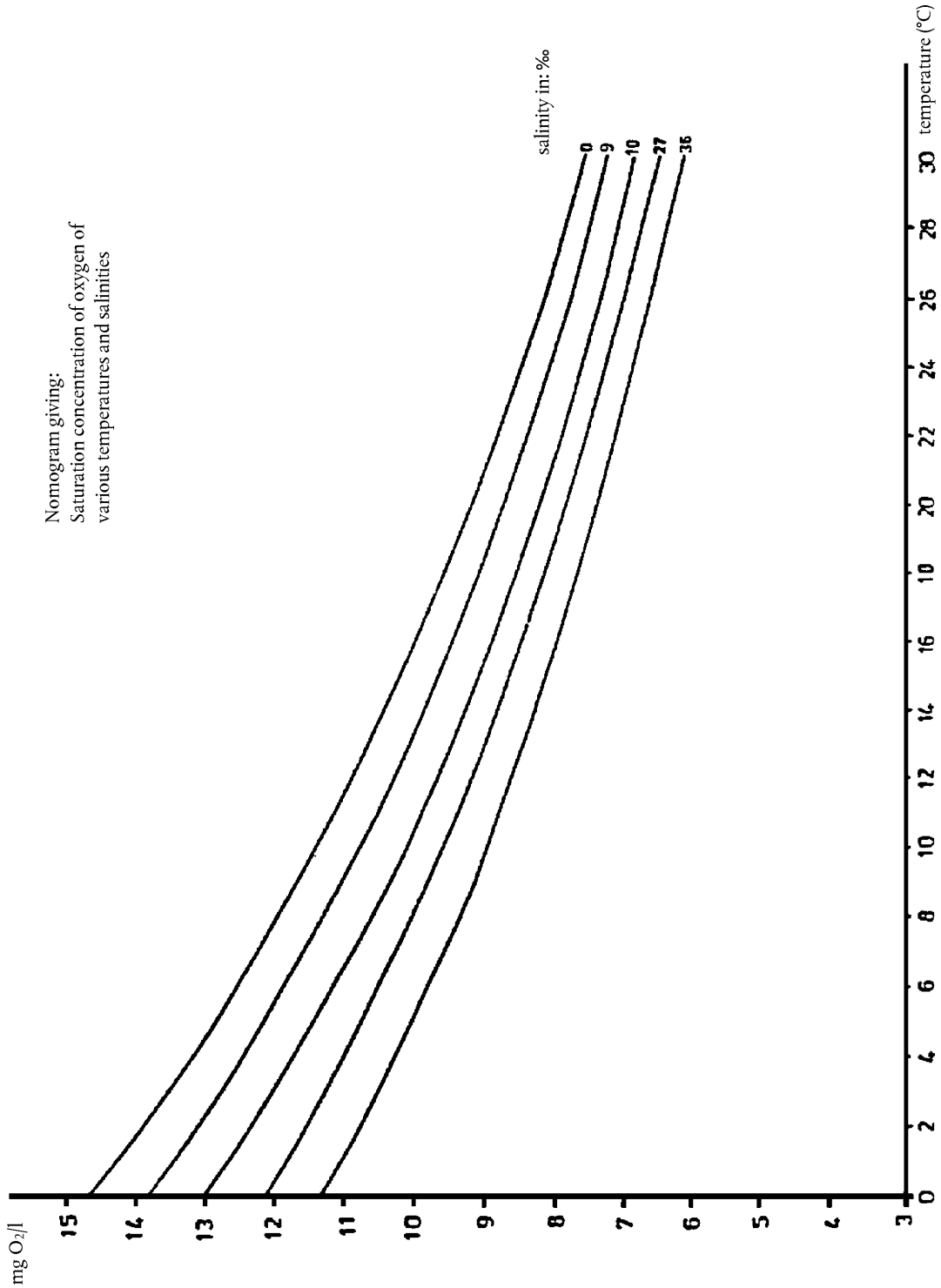
Jekk tiġi osservata formazzjoni ta' nitrat sħiħ permezz ta' analiżi fil-każ tat-tieni amina:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mg\ substance$$

▼**M6**

Appendiċi 4



▼M6

Appendiċi 5

Bijodegradazzjoni fl-ilma baħar

METODU TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ

SKEDA TAD-DEJTA

1. **LABORATORJU:**

2. **DATA FIL-BIDU TAT-TEST:**

3. **SUSTANZA TAT-TEST:**

Isem:

Konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija:	mg/l
Konċ. inizjali fil-midjum ta' ilma baħar:	mg/l
ThOD jew COD:	mg O_2/mg sustanza tat-test

4. **LMA BAĦAR:**

Is-sors:

Id-data tat-teħid:

Il-fond tat-teħid:

Id-dehra f'ħin it-teħid (eż. imċajpar, eċċ.):

Is-salinità fit-teħid:	‰
It-temperatura fit-teħid:	°C
Id-DOC "x" sigħat wara t-teħid:	mg/l

Il-pretrattament qabel l-ittestjar (eż. filtrazzjoni, sedimentazzjoni, żmien kemm tħalla jiqdiem, eċċ.):

L-għadd tal-kolonja mikrobjali	— kampjun oriġinali:	kolonji/ml
	— fil-bidu tat-test:	kolonji/ml

Karatteristiċi oħrajn:

5. **MIDJUM TAT-TEST:**

It-temperatura wara l-għoti tal-arja:	°C
Il-konċentrazzjoni tal-O_2 wara l-għoti tal-arja u l-qagħda qabel jibda t-test:	mg O_2/l

6. **DETERMINAZZJONI TAD-DO:**

Metodu: Winkler/elettrodu

	Nru tal-flask		mg O_2/l wara n jiem			
			0	5	15	28
Test: nutrijent — ilma baħar miżjud bis-sustanza tat-test	1	a_1				
	2	a_2				
	Test medju	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Nru tal-flask		mg O_2/l wara n jiem			
			0	5	15	28
Inbjank: nutrijent — ilma baħar miżjud, iżda mingħajr is-sustanza tat-test	1	c_1				
	2	c_2				
	Inbjank medju	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Nota: Jista' jintuża format simili għas-sustanza ta' referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **TNAQQIS TAD-DO: % DEGRADAZZJONI (%D):**

	It-tnaqqis tad-DO wara n jiem		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{test\ substance(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Dan jissuponi li $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, fejn
$m_{b(o)}$ = il-valur inbjank fil-jum 0,
$m_{t(o)}$ = il-valur tas-sustanza tat-test fil-jum 0.
Jekk $m_{b(o)}$ mhuwiex daqs $m_{t(o)}$, uża $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, fejn
$m_{b(x)}$ = il-valur inbjank fil-jum x,
$m_{t(x)}$ = il-valur tas-sustanza tat-test fil-jum x.

▼M6

C.43. IL-BIJODEGRADABILITÀ ANEJROBIKA TAS-SUSTANZI ORGANIĊI FIL-ĦAMA DIĠESTITA: BIL-KEJL TAL-PRODUZZJONI TAL-GASS

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwiavlenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 311 tal-OECD (2006). Hemm għadd ta' testijiet ta' tgħarbil għall-valutazzjoni tal-bijodegradabilità aerobika tas-sustanzi organiċi (Metodi ta' ttestjar C.4, C.9, C.10, u C.11 (1) u t-TG 302C tal-OECD (2)) u r-riżultati tal-applikazzjoni tagħhom intużaw b'suċċess sabiex jitbassar l-eżitu tas-sustanzi fl-ambjent aerobiku, b'mod partikolari fl-istadji aerobiċi tat-trattament tal-ilma mormi. Bosta proporzjonijiet ta' sustanzi li solubbli fl-ilma, kif ukoll ta' dawk li jassorbu mas-solidi tal-iskart, huma indirizzati b'mod aerobiku wkoll, peress li huma preżenti fi drenaġġ dikantat. Madankollu, il-partijiet il-kbar ta' dawn is-sustanzi huma mqabbdin mal-ħama dikantata primarja, li hija separata mid-drenaġġ mhux ipproċessat f'vaski ta' dikantazzjoni qabel ma d-drenaġġ dikantat, jew supernatant, jiġi ttrattat b'mod aerobiku. Imbagħad, il-ħama, li fiha wħud mis-sustanzi solubbli fil-likwidu interstizjali, titgħadda f'diġestituri msaħħnin għat-trattament anaerobiku. Għalissa għad ma hemm ebda test f'din is-serje għall-valutazzjoni tal-bijodegradabilità anaerobika f'diġestituri anaerobiċi u dan it-test għandu l-għan li jneħħi din id-diskrepanza; mhux bilfors ikun applikabbli għal kompartimenti ambjentali anossiċi oħrajn.

2. Tekniki respirometriċi li jkejlu l-ammonti ta' gass prodott, b'mod partikolari l-metan (CH_4) u d-diossidu tal-karbonju (CO_2) intużaw b'suċċess f'kundizzjonijiet anaerobiċi sabiex tiġi vvalutata l-bijodegradabilità anaerobika. Birch et al (3) irrevedew dawn il-proċeduri u kkonkludew li l-ħidma ta' Shelton u Tiedje (4), fuq il-bażi tal-istudji preċedenti tagħhom (5)(6)(7), kienet l-iktar waħda komprensiva. Il-metodu (4), li kompla jiġi żviluppat minn oħrajn (8) u li sar l-istandards Amerikani (9)(10), ma solviex il-problemi marbutin mas-solubilitajiet differenti tas-CO_2 u CH_4 fil-midjum tat-test u mal-kalkolu tal-produzzjoni teorika tal-gass ta' sustanza tat-test. Ir-rapport tal-ECETOC (3) irrakkomanda l-kejl addizzjonali tal-kontenut ta' karbonju inorganiku dissolt (DIC) tal-likwidu supernatant, li għamel it-teknika ferm iktar ġeneralment applikabbli. Il-metodu tal-ECETOC kien soġġett għal eżerċizzju internazzjonali ta' kalibraġġ (jew ringtest) u sar l-Istandard tal-ISO, ISO 11734 (11).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar, li kien ibbażat fuq l-ISO 11734 (11), jiddeskrivi metodu ta' tgħarbil għall-evalwazzjoni tal-bijodegradabilità anaerobika potenzjali ta' sustanzi organiċi f'kundizzjoni speċifika (jiġifieri f'diġestitur anaerobiku fi żmien partikolari u medda ta' konċentrazzjoni ta' mikroorganiżmi). Peress li ħama dilwita tintuża b'konċentrazzjoni relattivament għolja tas-sustanza tat-test u d-durata tat-test tipikament tkun itwal mill-ħin ta' żamma fid-diġestituri anaerobiċi, il-kundizzjonijiet tat-test mhux bilfors ikunu jikkorrispondu għall-kundizzjonijiet f'diġestituri anaerobiċi, u din lanqas ma hija applikabbli għall-valutazzjoni tal-bijodegradabilità anaerobika tas-sustanzi organiċi f'kundizzjonijiet ambjentali differenti. Il-ħama tiġi esposta għas-sustanza tat-test sa 60 jum, perjodu itwal miż-żmien normali ta' żamma tal-ħama (25 sa 30 jum) f'diġestituri anaerobiċi, għad li f'żoni industrijali ż-żminijiet ta' żamma jistgħu jkunu ferm itwal. Il-previżjonijiet mir-riżultati ta' dan it-test ma jistgħux ikunu daqstantieħor konvinċenti bħal fil-każ ta' bijodegradazzjoni aerobika, peress li l-evidenza miġbura dwar l-imġiba tas-sustanzi tat-test f'testijiet aerobiċi "lesti" u f'testijiet ta' simulazzjoni u l-ambjent aerobiku huwa biżżejjed biex ikun hemm fiduċja li hemm rabta; ftit li xejn teżisti evidenza simili għall-ambjent anaerobiku. Huwa supponut li l-bijodegradazzjoni anaerobika sħiħa sseħħ jekk tintlaħaq 75 %-80 % tal-produzzjoni teorika tal-gass. Il-proporzjonijiet għoljin tas-sustanza għall-bijomassa użata f'dawn it-testijiet ifissru li sustanza li tgħaddi għandha probabilità ikbar li tiġi degradata f'diġestitur anaerobiku. Barra minn

▼M6

hekk, sustanzi li ma jirnexxilhomx jiġu kkonvertiti f'gass fit-test mhux bilfors jippersistu fi proporzjonijiet ta' sustanza għall-bijomassa iktar ambjentalment realistiċi. Barra minn hekk, iseħħu reazzjonijiet anaerobiċi oħrajn li fihom is-sustanzi jistgħu jkunu tal-inqas parzjalment degradati, eż. b'deklorinazzjoni, iżda dan it-test ma jidentifikax it-tali reazzjonijiet. Madankollu, bl-applikazzjoni tal-metodi analitiċi speċifiċi għad-determinazzjoni tas-sustanza tat-test, l-għibien tagħha tista' tiġi ssorveljata (ara l-paragrafi 6, 30, 44 u 53).

PRINĊIPJU TAT-TEST

4. Ħama diġestita maħsula ([1]), li fiha konċentrazzjonijiet baxxi (< 10 mg/l) ta' karbonju inorganiku (IC), tiġi dilwita għaxar darbiet għal konċentrazzjoni ta' solidi totali ta' 1 g/l sa 3 g/l u inkubata f'35 °C ± 2 °C f'reċipjenti ssiġillati bis-sustanza tat-test f'20 sa 100 mg C/l sa 60 jum. Jiġi pprovdut għall-kejl tal-attività tal-ħama billi jsiru kontrolli inbjank paralleli b'inokulu tal-ħama fil-midjum iżda mingħajr is-sustanza tat-test.

5. Titkejjel iż-żieda fil-pressjoni tal-ispazju vojt fuqani fir-reċipjenti li tirriżulta mill-produzzjoni tad-diossidu tal-karbonju u l-metan. Ħafna mis-CO_2 prodott ser jiġi dissolt fil-fażi likwida jew jiġi ttrasformat f'karbonat jew karbonat tal-idroġenu fil-kundizzjonijiet tat-test. Il-karbonju inorganiku jitkejjel fi tmiem it-test.

6. L-ammont ta' karbonju (inorganiku flimkien mal-metan) li jirriżulta mill-bijodegradazzjoni tas-sustanza tat-test jiġi kkalkolat mill-produzzjoni netta ta' gass u l-formazzjoni netta ta' IC fil-fażi likwida oltre l-valuri tal-kontroll inbjank. Il-firxa tal-bijodegradazzjoni tiġi kkalkolata mill-IC totali u l-metan-C prodott bħala perċentwal tal-ammont imkejjel u kkalkolat ta' karbonju miżjud bħala sustanza tat-test. Kif qed tipproċedi l-bijodegradazzjoni jista' jiġi segwit billi jittieħdu kejliet intermedji tal-produzzjoni tal-gass biss. Barra minn hekk, il-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi stabbilita b'analiżijiet speċifiċi fil-bidu u fi tmiem it-test.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

7. Il-karatteristiċi tal-purità, is-solubilità tal-ilma, il-volatilità u l-assorbiment tas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufin sabiex tkun tista' ssir interpretazzjoni tajba tar-riżultati. Il-kontenut tal-karbonju organiku (% w/w) tas-sustanza tat-test irid ikun magħruf jew mill-istruttura kimika tiegħu jew b'kejl. Għal sustanzi tat-test volatili, kostanti tal-liġi ta' Henry imkejjel jew ikkalkolat jgħin fid-deċiżjoni ta' jekk test huwiex applikabbli. Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għal batterji anaerobiċi hija siewja meta tingħażel konċentrazzjoni xierqa tat-test, u sabiex jiġu interpretati riżultati li juru bijodegradabilità dgħajfa. Huwa rrakkomandat li jiġi inkluż il-kontroll tal-inibizzjoni sakemm ma jkunx magħruf li s-sustanza tat-test mhijiex inibitorja għal attivitajiet mikrobjali anaerobiċi (ara l-paragrafu 21 u l-ISO 13641-1 (12)).

([1]) Il-ħama diġestita hija taħlita tal-fażijiet dikantati tad-drenaġġ u l-ħama attivata, li ġew inkubati f'diġestitur anaerobiku f'madwar 35 °C sabiex jonqsu l-bijomassa u l-problemi tal-irwejjaħ u sabiex titjieb il-ħila tal-ħama li tneħħi l-ilma. Tikkonsisti f'ġemgħa ta' batterji metanoġeniċi u fermentattivi anaerobiċi li jipproduċu diossidu tal-karbonju u metan (11).

▼M6

APPLIKABILITÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jiġi applikat għal sustanzi li jinħallu fl-ilma; jista' jiġi applikat ukoll għal sustanzi ftit li xejn solubbli u insolubbli, diment li jintuża metodu ta' dożaġġ eżatt. eż. ara l-ISO 10634 (13). B'mod ġenerali, għal sustanzi volatili hemm bżonn ta' deċiżjoni każ, każ. Jista' jkun hemm bżonn li jittieħdu passi speċjali, pereżempju, sabiex ma jinħelisx gass matul it-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

9. Biex tivverifika l-proċedura, tiġi ttestjata sustanza ta' referenza billi jiġu stabbiliti reċipjenti xierqa b'mod parallel bħala parti mit-testijiet normali. Fenol, benżoat tas-sodju u polietilen glikol 400 huma eżempji u jkunu mistennijin li jiġu degradati bi produzzjoni teorika ta' gass ogħla minn 60 % (jiġifieri metan u karbonju inorganiku) fi żmien 60 jum (3)(14).

RIPRODUĊIBILITÀ TAR-RIŻULTATI TAT-TEST

10. F'ringtest internazzjonali (14) kien hemm riproduċibilità tajba f'kejliet tal-pressjoni tal-gass bejn reċipjenti ta' triplikati. Id-devjazzjoni standard relattiva (koeffiċjent ta' varjazzjoni, COV) kienet fil-parti l-kbira inqas minn 20 %, għad li dan il-valur spiss żdied għal > 20 % fil-preżenza ta' sustanzi tossiċi jew lejn tmiem il-perjodu ta' inkubazzjoni ta' 60 jum. Instabu devjazzjonijiet ogħla f'reċipjenti b'volum ta' < 150 ml ukoll. Il-valuri finali tal-pH tal-midjums tat-test kienu fil-medda 6,5-7,0.

11. Fir-ringtest inkisbu r-riżultati li ġejjin.

Sustanza tat-test	Dejta totali n_1	Degradazzjoni medja (tad-dejta totali) (%)	Devjazzjoni Standard relattiva (tad-dejta totali) (%)	Dejta valida n_2	Degradazzjoni medja (tad-dejta totali) (%)	Devjazzjoni Standard relattiva (tad-dejta totali) (%)	Dejta > 60 % degradazzjoni f'testijiet validi n_3
Aċidu palmitiku	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilen Glikol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporzjon ta' n_2

12. Il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni tal-medja għall-valuri kollha miksubin bl-aċidu palmitiku u l-polietilen glikol 400 telgħu sa 45 % (n = 36) u 35 % (n = 38) rispettivament. Meta tneħħew il-valuri < 40 % u > 100 % (b'dawk imsemmijin l-ewwel li ġew supponuti li kienu dovuti għal kundizzjonijiet mhux ottimali, u tal-aħħar għal raġunijiet mhux magħrufin), is-COVs tnaqqsu għal 26 % u 23 %, rispettivament. Il-proporzjonijiet tal-valuri "validi" li kisbu degradazzjoni minima ta' 60 % kienu 70 % għal aċidu palmitiku u 83 % għal polietilen glikol 400. Il-proporzjonijiet tal-bijodegradazzjoni perċentwali derivata mill-kejliet tad-DIC kienu relattivament baxxi iżda varjabbli. Għall-aċidu palmitiku, il-medda kienet ta' 0-35 %, il-medja 12 %, b'COV ta' 92 % u għal polietilenglikol 400 0-40 %, medja 24 %, b'COV ta' 54 %.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Apparat

13. Huma meħtieġa t-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dawn li ġejjin:

(a) Inkubatur — li jilqa' għall-isparks u kkontrollata f'35 °C ± 2 °C;

▼M6

(b) Reċipjenti tat-test tal-ħġieġ reżistenti għall-pressjoni ta' daqs nominali xieraq ([1]), b'kull wieħed mgħammar b'septum issiġillat għall-gass, li jiflaħ madwar 2 bar. Il-volum tal-ispazju vojt fuqani għandu jkun ta' madwar 10 % sa 30 % mill-volum totali. Jekk il-bijogass jinħeles b'mod regolari, madwar 10 % tal-volum tal-ispazju vojt fuqani huwa xieraq, iżda jekk il-ħelsien tal-gass iseħħ biss fi tmiem it-test, 30 % huwa xieraq. Fliexken tas-serum tal-ħġieġ, b'volum nominali ta' 125 ml u volum totali ta' 160 ml, issiġillat b'septa tas-serum. ([2]) u ċrieki tal-aluminju bil-pressa huma rrakkomandati meta tinħeles il-pressjoni f'kull ħin ta' teħid tal-kampjuni;

(c) Apparat għall-kejl tal-pressjoni ([3]) adattat sabiex ikun jista' jitkejjel u jiġi vventjat il-gass prodott, pereżempju, apparat portabbli li jkellel il-pressjoni bi preċiżjoni mqabbad ma' labra ta' siringa xierqa; valv issiġillat għall-gass tridirezzjonali jħaffef il-ħlus ta' pressjoni żejda (Appendiċi 1). Hemm bżonn li l-volum intern tat-tubi u l-valv tat-transdjuser tal-pressjoni jinżamm baxx kemm jista' jkun, sabiex l-iżbalji dovuti għat-twarrib tal-volum tat-tagħmir ma jkunux sinifikanti.

Nota — Il-qari tal-pressjoni jintuża direttament sabiex jiġi kkalkolat l-ammont ta' karbonju prodott fl-ispazju vojt fuqani (paragrafi 42 sa 44). Inkella, il-qari tal-pressjoni jista' jiġi kkonvertit f'volumi (f'35 °C, pressjoni atmosferika) ta' gass prodott bl-użu ta' graff tal-konverżjoni. Dan il-graff jinbena minn dejta miksuba bl-injezzjoni ta' volumi magħrufin ta' gass tan-nitroġenu f'serje ta' reċipjenti tat-test (eż. fliexken tas-serum) f'35 ° +/– 2 °C u r-reġistrazzjoni tal-qari tal-pressjoni stabbilizzata li jirriżulta (Ara l-Appendiċi 2). Il-kalkolu jintwera fin-Nota fil-paragrafu 44.

Attenzjoni — Ara li tevita korrimenti bil-labra meta tuża mikrosiringi.

(d) Analizzatur tal-karbonju, xieraq għad-determinazzjoni diretta ta' karbonju inorganiku fil-medda ta' 1 mg/l sa 200 mg/l;

(e) Siringi bi preċiżjoni kbira għal kampjuni gassużi u likwidi;

(f) Segwituri u ħawwada manjetiċi (mhux bilfors);

(g) Kompartiment tal-ingwanti (rakkomandat);

Reaġenti

14. Uża reaġenti ta' grad analitiku l-ħin kollu.

([1]) Id-daqs rakkomandat huwa ta' 0,1 litru sa litru.

([2]) Huwa rrakkomandat li jintużaw septa tas-silikon issiġillati għall-gass. Huwa rrakkomandat ukoll li s-siġill għall-gass tat-tappijiet, speċjalment septa tal-butil lasktu, jiġi ttestjat għaliex ħafna septa disponibbli fis-suq ma jissiġillawx biżżejjed għall-gass kontra l-metan u ċerti septa ma jibqgħux issikkati meta jittaqqbu b'labra fil-kundizzjonijiet tat-test.

([3]) L-apparat għandu jintuża u jiġi kkalibrat f'intervalli regolari, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Jekk jintuża miter tal-pressjoni tal-kwalità preskritta, eż. kkapsulat b'membrana tal-azzar, mhija meħtieġa ebda kalibrazzjoni fil-laboratorju. Il-preċiżjoni tal-kalibrazzjoni tista' tiġi vverifikata fil-laboratorju b'kejl f'punt partikolari f'1×10^5 Pa b'miter tal-pressjoni b'displej mekkaniku. Meta dan il-punt jitkejjel b'mod korrett, il-linearità sejra tibqa' l-istess ukoll. Jekk jintużaw apparati oħrajn għall-kejl (mingħajr kalibraġġ iċċertifikat mill-manifattur), huwa rrakkomandat kalibraġġ fuq il-medda totali f'intervalli regolari.

▼M6

Ilma

15. Ilma distillat jew dejonizzat (deossiġenat bir-raxx bil-gass tan-nitroġenu li fih inqas minn 5 µl/l ossiġenu), li fih inqas minn 2 mg/l karbonju organiku dissolt (DOC).

Midjum tat-test

16. Ħejji l-midjum ta' dilwizzjoni biex dan ikun fih il-kostitwenti li ġejjin bl-ammonti ddikjarati;

Anidru potassju diidroġenu fosfat (KH_2PO_4)	0,27 g
Disodju idroġenu fosfat dodecahydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Klorid tal-ammonium, (NH_4Cl)	0,53 g
Kloru tal-kalċju diidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075g
Essaidrat tal-klorur tal-manjeżju ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Tetraidrat tal-klorur tal-ħadid (II) ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resażurina (indikatur tal-ossiġenu)	0,001g
Nonaidrat tas-sulfur tas-sodju ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Soluzzjoni ewlenija tal-elementi traċċa (mhux bilfors, paragrafu 18)	10 ml
Żid ilma deossiġenat (paragrafu 15)	sa litru

Nota: Għandu jintuża sulfur tas-sodju fornit ġdid jew inkella għandu jinħasel u jitnixxef qabel jintuża, sabiex tiġi żgurata kapaċità ta' tnaqqis suffiċjenti. It-test jista' jsir bla ma jintuża kompartiment tal-ingwanti (ara l-paragrafu 26). F'dan il-każ, il-konċentrazzjoni finali tas-sulfur tas-sodju fil-midjum għandha tiżdied għal 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ għal kull litru. Sulfur tas-sodju jista' jiżdied ukoll minn soluzzjoni ewlenija anaerobika xierqa permezz tas-septum tar-reċipjenti tat-test magħluqin peress li din il-proċedura ser tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni. Is-sulfur tas-sodju jista' jiġi sostitwit miċ-ċitrat tat-titanju (III) li jiżdied permezz tas-septum tar-reċipjenti tat-test magħluqin peress li din il-proċedura ser tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni. Iċ-ċitrat tat-titanju (III) huwa aġent reduċenti ferm effettiv u b'tossiċità baxxa, li jitħejja kif ġej: Ħoll 2,94 g ta' diidrat taċ-ċitrat tat-trisodju f'50 ml ilma deossiġenat (biex tikseb soluzzjoni ta' 200 mmol/l) użid 5 ml ta' 15 % (w/v) soluzzjoni tal-klorur tat-titanju (III) Innewtralizza għal pH 7 ± 0,2 b'alkali minerali u ixħet f'reċipjent xieraq taħt fluss ta' nitroġenu. Il-konċentrazzjoni taċ-ċitrat tat-titanju (III) f'din is-soluzzjoni ewlenija hija ta' 164 mmol/l.

17. Ħallat il-komponenti tal-midjum tat-test ħlief l-aġent reduċenti (ċitrat tat-titanju tas-sulfur tas-sodju) u ixħet raxx ta' gass tan-nitroġenu fuq is-soluzzjoni għal madwar 20 min eżatt qabel l-użu sabiex tneħħi l-ossiġenu. Imbagħad żid il-volum xieraq tas-soluzzjoni mħejjija ġdida tal-aġent reduċenti (ħejji f'ilma deossiġenat) eżatt qabel ma tuża l-midjum Aġġusta l-pH tal-midjum, jekk ikun hemm bżonn, b'alkali jew aċidu minerali dilwit għal 7 ± 0,2.

▼M6

Soluzzjoni ewlenija tal-elementi traċċa (mhux bilfors)

18. Huwa rrakkomandat li l-midjum tat-test għandu jkun fih l-elementi traċċa li ġejjin sabiex jitjiebu l-proċessi ta' degradazzjoni anaerobika, speċjalment jekk jintużaw konċentrazzjonijiet baxxi (eż. 1g/l) ta' innokulu (11).

Manganese chloride tetrahydrate ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Aċidu boriku (H_3BO_3)	5 mg
Klorur taż-żingu ($ZnCl_2$)	5 mg
Klorur tar-ram (II) ($CuCl_2$)	3 mg
Disodium molybdate dihydrate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Essaidrat tal-klorur tal-kobalt ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Essaidrat tal-klorur tal-nikil ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Disodium selenite (Na_2SeO_3)	5 mg
Żid l-ilma deossiġenat (paragrafu 15)	sa litru

Sustanza tat-test

19. Żid is-sustanza tat-test bħala soluzzjoni ewlenija, sospensjoni, emulsjoni jew direttament bħala solida jew likwida, jew assorbita ma' filtru tal-fibra tal-ħġieġ biex tikseb konċentrazzjoni ta' xejn iktar minn 100 mg/l karbonju organiku. Jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin, ħejji soluzzjoni xierqa bl-ilma (paragrafu 15) (deossiġenata minn qabel permezz ta' raxx ta' gass tan-nitroġenu) ta' saħħa tali li l-volum miżjud ikun inqas minn 5 % tal-volum totali tat-taħlita tar-reazzjoni. Aġġusta l-pH tas-soluzzjoni ewlenija għal pH 7 ± 0,2 jekk ikun hemm bżonn. Għas-sustanzi tat-test li ma jkunux solubbli biżżejjed fl-ilma, ikkonsulta l-ISO 10634 (13). Jekk jintuża solvent, ħejji kontroll addizzjonali, bis-solvent biss miżjud mal-midjum inokulat. Għandhom jiġu evitati solventi organiċi li huma magħrufin li jinibixxu l-produzzjoni tal-metan, bħall-kloroform u t-tetraklorur tal-karbonju.

Attenzjoni — Qandel sustanzi tat-test tossiċi u dawk bi karatteristiċi mhux magħrufin bil-galbu.

Sustanzi ta' referenza

20. Is-sustanzi ta' referenza bħall-benżoat tas-sodju, il-fenol u l-polietilen glikol 400 intużaw b'suċċess sabiex tiġi vverifikata l-proċedura, u ġew bijodegradati b'iktar minn 60 % fi żmien 60 jum. Ħejji soluzzjoni ewlenija (f'ilma deossiġenat) tas-sustanza ta' referenza magħżula bl-istess mod bħas-sustanza tat-test u aġġusta għal pH 7 ± 0,2 jekk ikun hemm bżonn.

Kontroll tal-inibizzjoni (kundizzjonali)

21. Sabiex tinkiseb informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għal mikroorganiżmi anaerobiċi biex issib l-iktar konċentrazzjoni tat-test xierqa, żid is-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza f'reċipjent li fih il-midjum tat-test (ara l-paragrafu 16), b'kull waħda bl-istess konċentrazzjonijiet kif miżjudin, rispettivament (ara l-paragrafi 19 u 20 u ara wkoll l-ISO 13641 — 1 (12)).

▼M6

Ħama diġestita

22. Iġbor il-ħama diġestita minn diġestitur f'impjant għat-trattament tal-ilma mormi li jittratta fil-parti l-kbira drenaġġ domestiku. Il-ħama għandha tiġi kkaratterizzata bis-sħiħ u l-informazzjoni ta' sfond dwarha għandha tiġi rrapportata (ara l-paragrafu 54). Jekk huwa maħsub li ser isir użu mill-inokulu adattat, tista' tiġi kkunsidrata ħama diġestita minn impjant tat-trattament tad-drenaġġ industrijali. Uża fliexken b'għonq wiesa' mibnijin minn polieetilen b'densità għolja jew materjal simili, li jista' jespandi, għall-ġbir tal-ħama diġestita. Żid il-ħama sa madwar 1cm mill-quċċata tal-fliexken u ssiġillahom sew, idealment b'valv tas-sikurezza. Wara li tittrasportaha fil-laboratorju, il-ħama miġbura tista' tituża direttament jew titqiegħed f'diġestitur ta' skala tal-laboratorju. Eħles il-bijogass żejjed billi tiftaħ il-fliexken tal-ħama bil-galbu. Inkella, tista' tintuża ħama anaerobika mkabbra fil-laboratorju bħala sors ta' inokulu iżda jista' jkun li l-ispettru ta' attività tagħha ġie indebolit.

Attenzjoni — Il-ħama diġestita tipproduċi gassijiet li jaqbdu u li jippreżentaw riskji ta' nirien u splużjoni: potenzjalment fiha wkoll organiżmi patoġeniċi, u għalhekk għandek tieħu l-prekawzjonijiet xierqa meta tqandel il-ħama. Għal raġunijiet ta' sikurezza, tużax reċipjenti tal-ħġieġ biex tiġbor il-ħama.

23. Sabiex tonqos il-produzzjoni tal-gass ta' sfond u tonqos l-influwenza tal-kontrolli inbjank, tista' tiġi kkunsidrata prediġestjoni tal-ħama. Jekk ikun hemm bżonn ta' prediġestjoni, il-ħama għandha titħalla tiddiġesti mingħajr ma jiżdied ebda nutrijent jew subtstrat f'35 °C ± 2 °C għal mhux iktar minn 7 ijiem. Instab li l-prediġestjoni għal madwar 5 ijiem normalment tipprovdi tnaqqis ottimali fil-produzzjoni tal-gass tal-inbjank mingħajr żidiet mhux aċċettabbli fil-perjodi ta' dewmien jew ta' inkubazzjoni matul il-fażi tat-test jew telf ta' attività f'numru żgħir tas-sustanzi ttestjati.

24. Għas-sustanzi tat-test li ftit li xejn huma bijodegradabbli, jew li huma mistennijin li jkunu hekk, ikkunsidra l-preespożizzjoni tal-ħama għas-sustanza tat-test biex tikseb inokulu iktar adattat. F'każ bħal dan, żid is-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni tal-karbonju organiku ta' 5 mg/l għal 20 mg/l mal-ħama diġestita u inkubata sa massimu ta' ġimgħatejn. Aħsel il-ħama preesposta bil-galbu qabel tużaha (ara l-paragrafu 25) u indika fir-rapport tat-test il-kundizzjonijiet tal-preespożizzjoni.

Inokulu

25. Aħsel il-ħama (ara l-paragrafi 22 sa 24) eżatt qabel tużaha, biex tnaqqas il-konċentrazzjoni tal-IC għal inqas minn 10 mg/l fis-sospensjoni tat-test finali. Iċċentrifuga l-ħama f'tubi ssiġillati (eż. 3 000 g matul 5 min) u armi s-supernatant. Issospendi l-pelit li jirriżulta f'midjum deossiġenat (paragrafi 16 u 17), erġa' ċċentrifuga s-sospensjoni u armi l-likwidu supernatanti. Jekk l-IC ma naqsitx biżżejjed, il-proċedura ta' ħasil tal-ħama tista' tiġi ripetuta għal massimu ta' darbtejn. Dan ma jidhirx li jaffettwa l-mikroorganiżmi b'mod avvers. Fl-aħħar nett, issospendi l-pelit fil-volum meħtieġ tal-midjum tat-test u stabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-solidi totali [eż. ISO 11923 (15)]. Il-konċentrazzjoni finali tas-solidi totali fir-reċipjenti tat-test għandha tkun fil-medda ta' 1 g/l sa 3 g/l (jew madwar 10 % ta' dik fil-ħama diġestita mhux dilwita). Agħmel l-operazzjonijiet ta' hawn fuq b'tali mod li l-ħama ftit li xejn tidħol f'kuntatt mal-ossiġenu (eż. uża atmosfera tan-nitroġenu).

▼M6

PROĊEDURA TAT-TEST

26. Agħmel il-proċeduri inizjali li ġejjin billi tuża tekniki biex iżżomm il-kuntatt bejn il-ħama diġestita u l-ossiġenu baxx kemm jista' jkun, pereżempju, jista' jkun hemm bżonn li jsir xogħol ġewwa kompartiment tal-ingwanti f'atmosfera ta' nitroġenu u/jew tagħmel porga tal-fliexken bin-nitroġenu (4).

Tħejjija tal-assaġġi tat-test u tal-kontroll

27. Ħejji tal-inqas reċipjenti tat-test triplikati (ara l-paragrafu 13-b) għas-sustanza tat-test, kontrolli inbjank, sustanza ta' referenza, kontrolli ta' inibizzjoni (kundizzjonali) u kompartimenti ta' kontroll tal-pressjoni (proċedura mhux obbligatorja) (ara l-paragrafi 7, 19 sa 21). Jistgħu jitħejjew ukoll reċipjenti addizzjonali sabiex tiġi evalwata l-bijodegradazzjoni primarja bl-użu ta' analiżijiet speċifiċi għas-sustanza tat-test. L-istess sett ta' kontrolli inbjank jista' jintuża għal bosta sustanzi tat-test fl-istess test diment li l-volumi tal-ispazju vojt fuqani jkunu konsistenti.

28. Ħejji l-inokulu dilwit qabel ma żżidu fir-reċipjenti eż. permezz ta' pipetta b'toqba wiesgħa. Żid l-alikwoti ta' inokulu mħawwad sew (paragrafu 25) sabiex il-konċentrazzjoni tas-solidi totali tkun l-istess fir-reċipjenti kollha (bejn 1 g/l u 3 g/l). Żid is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza tat-test u ta' referenza wara li taġġustahom għal pH 7 ± 0,2, jekk ikun hemm bżonn. Is-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza għandhom jiżdiedu bl-użu tal-iktar rotta tal-amministrazzjoni xierqa (paragrafu 19).

29. Is-soltu, il-konċentrazzjoni tat-test tal-karbonju organiku għandha tkun bejn 20 u 100 mg/l (paragrafu 4). Jekk is-sustanza tat-test tkun tossika, il-konċentrazzjoni tat-test għandha titnaqqas għal 20 mg C/l, jew saħansitra inqas jekk trid titkejjel biss il-bijodegradazzjoni primarja b'analiżijiet speċifiċi. Ta' min jinnota li l-varjabbiltà tar-riżultati tat-test tiżdied f'konċentrazzjonijiet inqas tat-test.

30. Għal reċipjenti inbjank, żid ammont ekwivalenti tat-trasportatur użat biex tiddoża s-sustanza tat-test minflok soluzzjoni ewlenija, sospensjoni jew emulsjoni. Jekk is-sustanza tat-test ingħatat bl-użu ta' filtri tal-fibra tal-gass jew solventi organiċi, żid mal-inbjanki filtru jew solvent b'volum ekwivalenti li ġie evaporat. Ħejji rreplikat żejjed b'sustanza tat-test għall-kejl tal-valur tal-pH. Aġġusta l-pH għal 7 ± 0,2, jekk ikun hemm bżonn, b'ammonti żgħar ta' alkali jew aċidu minerali dilwit. L-istess ammonti ta' aġenti newtralizzanti għandhom jiżdiedu fir-reċipenti kollha tat-test. Dawn iż-żidiet ma għandhomx ikunu saru peress li l-valur tal-pH tas-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza diġà jkun aġġustat (ara l-paragrafi 19 u 20). Sabiex titkejjel il-bijodegradazzjoni primarja, għandu jittieħed kampjun xieraq mir-reċipjent ta' kontroll tal-pH, jew minn reċipjent tat-test addizjonali, u l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha titkejjel bl-użu ta' analiżijiet speċifiċi. Fir-reċipjenti kollha jistgħu jiżdiedu kalamiti mgħottijin jekk iridu jitħawdu t-taħlitiet ta' reazzjoni (mhux bilfors).

31. Ara li l-volum totali tal-likwidu V_l u l-volum tal-ispazju vojt fuqani V_h huma l-istess fir-reċipjenti kollha; ħu nota u rreġistra l-valuri ta' V_l u V_h. Kull reċipjent għandu jiġi ssiġillat b'septum tal-gass u jiġi ttrasferit mill-kompartiment tal-ingwanti (ara l-paragrafu 26) fl-inkubatur (ara l-paragrafu 13-a).

▼M6

Sustanzi tat-test insolubbli

32. Żid l-ammonti mwieżna tas-sustanzi, li ftit li xejn huma solubbli fl-ilma, direttament fir-reċipjenti mħejjin. Meta jkun hemm bżonn li jsir użu minn solvent (ara l-paragrafu 19) ittrasferixxi s-soluzzjoni tas-sustanza tat-test jew is-sospensjoni fir-reċipjenti vojta. Meta dan ikun possibbli, evapora s-solvent billi tgħaddi gass tan-nitroġenu mir-reċipjenti u mbagħad żid l-ingredjenti l-oħrajn, jiġifeiri l-ħama dilwita (paragrafu 25) u l-ilma deossiġenat kif meħtieġ. Għandu jitħejja kontroll bis-solvent addizzjonali (ara l-paragrafu 19). Għal metodi oħrajn ta' kif jiżdiedu sustanzi insolubbli, jista' jiġi kkonsultat l-ISO 10634 (13). Is-sustanzi tat-test likwidi jistgħu jiġu dożati b'siringa fir-reċipjenti ssiġillati kompletament ippreparati, jekk ikun mistenni li l-pH inizjali mhijiex ser taqbeż is-7 ± 1, inkella doża kif spjegat iktar 'il fuq (ara l-paragrafu 19).

Inkubazzjoni u kejliet tal-pressjoni tal-gass

33. Inkuba r-reċipjenti mħejjin f'35 °C ± 2 °C għal madwar siegħa biex ikunu jistgħu jekwilibraw u eħles il-gass żejjed fl-atmosfera, pereżempju, billi theżżeż kull reċipjent għalih, billi ddaħħal il-labra tal-apparat li jkejjel il-pressjoni (paragrafu 13-c) mis-siġill u tiftaħ il-valv sakemm l-apparat li jkejjel il-pressjoni jaqra żero. Jekk f'dan l-istadju, jew meta jsiru kejliet intermedji, il-pressjoni tal-ispazju vojt fuqani tkun inqas minn dik atmosferika, għandu jiddaħħal gass tan-nitroġenu sabiex terġa' tiġi stabbilita l-pressjoni atmosferika. Agħlaq il-valv (ara l-paragrafu 13-c) u kompli inkuba fid-dlam, billi tiżgura li l-partijiet kollha tar-reċipjenti jinżammu fit-temperatura ta' diġestjoni. Żomm ir-reċipjenti taħt osservazzjoni wara l-inkubazzjoni għal 24 sa 48 siegħa. Irrifjuta r-reċipjenti jekk il-kontenuti tar-reċipjenti juru tilwin roża distint fil-likwidu supernatanti, jiġifieri jekk ir-Resażurina (ara l-paragrafu 16) tkun bidliet il-kulur, peress li dan jindika l-preżenza ta' ossiġenu (ara l-paragrafu 50). Filwaqt li s-sistema tista' tittollera ammonti żgħar ta' ossiġenu, konċentrazzjonijiet ogħla jistgħu jxekklu serjament il-bijodegradazzjoni anaerobika. Ir-rifjut ta' reċipjent wieħed kultant minn sett ta' triplikati jista' jiġi aċċettat, iżda l-inċidenza ta' ħafna iktar rifjuti trid iġġib magħha investigazzjoni fil-proċeduri sperimentali kif ukoll ir-ripetizzjoni tat-test.

34. Ħallat il-kontenuti ta' kull reċipjent bil-galbu billi tħawwadhom u theżżiżhom għal ftit minuti tal-inqas darbtejn jew tlieta fil-ġimgħa u ftit qabel kull kejl tal-pressjoni. It-theżżiż jerġa' jissospendi l-inokulu u jiżgura ekwilibriju gassuż. Il-kejliet tal-pressjoni kollha għandhom jittieħdu malajr, peress li r-reċipjenti tat-test jistgħu jkunu soġġetti għal tnaqqis tat-temperatura, li jwassal għal qari ħażin. Matul il-kejl, il-pressjoni tar-reċipjent tat-test kollu, inkluż l-ispazju vojt fuqani, għandu jinżamm fit-temperatura ta' diġestjoni. Kejjel il-pressjoni tal-gass, pereżempju, billi ddaħħal mis-septum il-labra tas-siringa (paragrafu 13-c) imqabbda mal-apparat li jissorvelja l-pressjoni. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat milli jidħol l-ilma fil-labra tas-siringa; jekk dan iseħħ, il-partijiet imxarrbin għandhom jiġu xxottati u titwaħħal labra ġdida. Il-pressjoni għandha titkejjel f'millibars (ara l-paragrafu 42). Il-pressjoni tal-gass fir-reċipjenti tista' titkejjel kull ċertu żmien, eż. darba fil-ġimgħa, u l-gass żejjed jista' jinħeles fl-atmosfera, iżda dan mhuwiex obbligatorju. Inkella, il-pressjoni titkejjel biss fi tmiem it-test sabiex jiġi stabbilit l-ammont ta' bijogass prodott.

35. Huwa rrakkomandat li jsir il-qari intermedju tal-pressjoni tal-gass, peress li żieda fil-pressjoni tipprovdi gwida dwar meta jista' jiġi tterminat it-test u tippermetti li tiġi segwita l-kinetika (ara l-paragrafu 6).

▼M6

36. Normalment, għandek ittemm it-test wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' 60 jum sakemm il-kurva ta' bijodegradazzjoni miksuba mill-kejliet tal-pressjoni ma tkunx laħqet il-fażi plateau qabel dak iż-żmien; dik hija l-fażi li fiha tkun intlaħqet id-degradazzjoni massima u l-kurva ta' bijodegradazzjoni tibqa' f'livell kostanti. Jekk il-valur tal-plateau jkun inqas minn 60 %, l-interpretazzjoni tkun diffiċli għaliex dan jindika li parti biss mill-molekola ġiet mineralizzata jew li seħħ żball. Jekk fi tmiem il-perjodu normali ta' inkubazzjoni jkun qed jiġi prodott gass iżda jkun ċar li ma ntlaħqitx fażi plataeu, f'dak il-każ għandu jiġi kkunsidrat jekk jittawwalx it-test sabiex jiġi vverifikat jekk huwiex ser jintlaħaq il-plateau (> 60 %).

Kejl tal-karbonju inorganiku

37. Fi tmiem it-test wara l-aħħar kejl tal-pressjoni tal-gass, ħalli l-ħama toqgħod. Iftaħ kull reċipjent għalih u mill-ewwel għandek tieħu kampjun biex issib il-konċentrazzjoni (mg/l) tal-karbonju inorganiku (IC) fil-likur supernatanti. La għandha tiġi applikata ċentrifugazzjoni u lanqas filtrazzjoni għal-likur supernatanti, peress li jkun hemm telf inaċċettabbli ta' diossidu tal-karbonju dissolt. Jekk il-likur ma jkunx jista' jiġi analizzat malli jittieħed il-kampjun, aħżnu f'kunjett issiġillat, mingħajr spazju vojt fuqani u mkessaħ għal madwar 4 °C għal massimu ta' jumejn. Wara l-kejl tal-IC, kejjel u rreġistra l-valur tal-pH.

38. Inkella, l-IC fis-supernatant jista' jiġi stabbilit indirettament bil-ħlus tal-IC dissolt bħala diossidu tal-karbonju li jista' jitkejjel fl-ispazju vojt fuqani. Wara l-aħħar kejl tal-pressjoni tal-gass, aġġusta l-pressjoni f'kull wieħed mir-reċipjenti tat-test għall-pressjoni atmosferika. Aċidifika l-kontenut ta' kull reċipjent għal madwar pH 1 billi żżid l-aċidu minerali kkonċentrat (eż. H_2SO_4) permezz tas-septum tar-reċipjenti ssiġillati). Inkuba r-reċipjenti mheżżin f'35 °C ± 2 °C għal madwar 24 siegħa u kejjel il-pressjoni tal-gass li tirriżulta mid-diossidu tal-karbonju evolut billi tuża l-apparat li jkejjel il-pressjoni.

39. Agħmel qari simili għas-sustanza inbjank ta' referenza korrispondenti u, jekk inkluži, ir-reċipjenti tal-kontroll ta' inibizzjoni (ara l-paragrafu 21).

40. F'ċerti każijiet, speċjalment jekk jintużaw l-istess reċipjenti tal-kontroll għal bosta sustanzi tat-test, il-kejliet tal-konċentrazzjonijiet intermedji tal-IC fir-reċipjenti tat-test u tal-kontroll għandhom jiġu kkunsidrati, kif ikun xieraq. F'dan il-każ, għandu jitħejja numru suffiċjenti ta' reċipjenti għall-kejliet intermedji kollha. Dan il-proċediment huwa ppreferut milli meta jittieħdu l-kampjuni kollha minn reċipjent wieħed biss. Dan tal-aħħar jista' jsir biss jekk il-volum meħtieġ għall-analiżi tad-DIC ma jitqiesx li jkun għoli wisq. Il-kejl tad-DIC għandu jsir wara li titkejjel il-pressjoni tal-gass mingħajr ma jinħeles il-gass eċċessiv kif deskritt hawn taħt:

— ħu l-iżgħar volum possibbli ta' kampjuni ta' supernatant b'siringa mis-septum bla ma tiftaħ ir-reċipjenti sabiex jiġi stabbilit l-IC fil-kampjun;

— wara li tieħu l-kampjun jinħeles jew ma jinħelisx il-gass eċċessiv;

— għandu jitqies li anki tnaqqis żgħir fil-volum tas-supernatant (eż. madwar 1 %) jista' jikkaġuna żieda sinifikanti fil-volum tal-gass tal-ispazju vojt fuqani (V_h);

— l-ekwazzjonijiet (ara l-paragrafu 44) huma kkoreġuti billi jiżdied V_h fl-ekwazzjoni 3, skont kif ikun meħtieġ.

▼M6

Analiżijiet speċifiċi

41. Jekk trid tiġi stabbilita degradazzjoni anaerobika primarja (ara l-paragrafu 30), ħu volum xieraq tal-kampjun għal analiżijiet speċifiċi fil-bidu u fi tmiem it-test mir-reċipjenti li fihom is-sustanza tat-test. Jekk isir hekk, kun af li l-volumi tal-ispazju vojt fuqani (V_h) u tal-likwidu (V_l) ser jinbidlu u dan għandek tikkunsidrah meta tikkalkola r-riżultati tal-produzzjoni tal-gass. Inkella, jistgħu jittieħdu kampjuni għal analiżijiet speċifiċi mit-taħlitiet ad-dizzjonali li qabel ġew stabbiliti għal dan il-għan (paragrafu 30).

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

42. Għal raġunijiet pratiċi, il-pressjoni tal-gass titkejjel f'millibars (1 mbar = 1h Pa = 102 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), il-volum f'litri u t-temperatura fi gradi Celsius.

Karbonju fl-ispazju vojt fuqani

43. Peress li 1 mol tal-metan u 1 mol tad-diossidu tal-karbonju fihom 12-il g karbonju, il-massa tal-karbonju f'volum partikolari ta' gass evolut tista' tingħata bħala:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ekwazzjoni [1]}$$

fejn:

m = il-massa ta' karbonju (mg) f'volum partikolari ta' gass evolut;

12 = il-massa atomika relattiva ta' karbonju;

n = in-numru ta' moli ta' gass fil-volum partikolari.

Jekk gass li mhuwiex metan jew diossidu tal-karbonju (eż. N_2O) jiġi ġġenerat f'ammonti konsiderevoli, il-formula [1] għandha tiġi emendata sabiex tiġi deskritta l-possibbiltà ta' effetti mill-gassijiet iġġenerati.

44. Mil-liġijiet tal-gass *n* jista' jingħata bħala:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Ekwazzjoni [2]}$$

fejn:

p = il-pressjoni tal-gass (Pascals);

V = il-volum tal-gass (m^3);

R = il-kostanti tal-gass molari [8,314J/(mol K)];

T = it-temperatura ta' inkubazzjoni (Kelvins).

Bit-tagħqid tal-ekwazzjonijiet [1] u [2] u r-razzjonalizzazzjoni sabiex tkun tista' ssir produzzjoni tal-kontroll inbjank tal-gass:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Ekwazzjoni [3]}$$

fejn:

m_h = il-massa tal-karbonju nett prodotta bħala gass fl-ispazju vojt fuqani (mg);

D*p* = il-medja tad-differenza bejn il-pressjonijiet inizjali u finali fir-reċipjenti tat-test neqes il-medja korrispondenti fir-reċipjenti inbjank (millibars);

▼M6

V_h = il-volum tal-ispazju vojt fuqani fir-reċipjent (l);

0,1 = il-konverżjoni kemm minn newtons/m^2 għal millibars kif ukoll minn m^3 għal litri.

L-ekwazzjoni [4] għandha tintuża għat-temperatura normali ta' inkubazzjoni ta' 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Ekwazzjoni [4]}$$

Nota: Kalkolu tal-volum alternattiv. Il-qari tal-apparat li jkejjel il-pressjoni jiġi kkonvertit f'ml ta' gass prodott bl-użu tal-kurva standard iġġenerata permezz tal-plot tal-volum (ml) injettat kontra l-qari tal-apparat li jkejjel (Appendiċi 2). In-numru ta' moli (n) ta' gass fl-ispazju vojt fuqani ta' kull reċipjent huwa kkalkolat billi tiġi diviża l-produzzjoni ta' gass kumulattiva (ml) b'25 286 ml/mol, li huwa l-volum okkupat minn mol wieħed ta' gass f'35 °C u pressjoni atmosferika standard. Peress li mol 1 ta' CH_4 u mol 1 ta' CO_2 fihom 12 g karbonju, l-ammont ta' karbonju (mg) fl-ispazju vojt fuqani (m_h) jinkiseb bl-ekwazzjoni [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Ekwazzjoni [5]}$$

Razzjonalizzazzjoni li tipprovdi għall-produzzjoni tal-kontroll inbjank tal-gass:

$$m_h = \frac{12\ 000 \times \Delta V}{25\ 286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Ekwazzjoni [6]}$$

fejn:

m_h = il-massa tal-karbonju nett prodotta bħala gass fl-ispazju vojt fuqani (mg);

DV = il-medja tad-differenza bejn il-volum ta' gass prodott fl-ispazju vojt fuqani fir-reċipjenti tat-test u r-reċipjenti tal-kontroll inbjank;

25286 = il-volum okkupat minn gass tal-mol 1 35 °C, atmosfera 1.

45. Kif mexiet il-bijodegradazzjoni jista' jiġi segwit billi tiġi pplottjata ż-żieda kumulata tal-pressjoni Dp (millibars) kontra ż-żmien, jekk xieraq. Minn din il-kurva, identifika u rreġistra l-fażi ta' dewmien (jiem). Il-fażi ta' dewmien hija ż-żmien mill-bidu tat-test sakemm tibda degradazzjoni sinifikanti (pereżempju ara l-Appendiċi 3). Jekk il-kampjuni intermedji tas-supernatant ittieħdu u ġew analizzati (ara l-paragrafi 40, 46 u 47), f'dak il-każ jista' jiġi pplottjat is-C totali prodott (f'gass flimkien ma' dak f'likwidu) minflok il-pressjoni kumulattiva biss.

Karbonju fil-likwidu

46. L-ammont ta' metan fil-likwidu huwa injorat peress li huwa magħruf li s-solubilità tiegħu fl-ilma hija baxxa ħafna. Ikkalkola l-massa ta' karbonju organiku fil-likwidu tar-reċipjenti tat-test billi tuża l-ekwazzjoni [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{Ekwazzjoni [7]}$$

fejn:

m_l = il-massa ta' karbonju inorganiku fil-likwidu (mg);

C_{net} = il-konċentrazzjoni ta' karbonju inorganiku fir-reċipjenti tat-test neqes dik fir-reċipjenti tal-kontroll fi tmiem it-test (mg/l);

V_l = il-volum ta' likwidu fir-reċipjenti tat-test (l).

▼M6

Karbonju gassifikat totali

47. Ikkalkola l-massa totali ta' karbonju gassifikat fir-reċipjent bl-użu tal-ekwazzjoni [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Ekwazzjoni [8]}$$

fejn:

m_t = il-massa totali ta' karbonju gassifikat (mg);

m_h u m_l huma kif iddefiniti iktar 'il fuq.

Karbonju tas-sustanza tat-test

48. Ikkalkola l-massa ta' karbonju fir-reċipjenti tat-test derivata mis-sustanza tat-test miżjuda bl-użu tal-ekwazzjoni [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Ekwazzjoni [9]}$$

fejn:

m_v = il-massa ta' karbonju tas-sustanza tat-test (mg);

C_c = il-konċentrazzjoni tal-karbonju tas-sustanza tat-test fir-reċipjent tat-test (mg/l)

V_l = il-volum ta' likwidu fir-reċipjenti tat-test (l).

Firxa tal-bijodegradazzjoni

49. Ikkalkola l-bijodegradazzjoni perċentwali mill-gass tal-ispazju vojt fuqani billi tuża l-ekwazzjoni [10] u l-bijodegradazzjoni perċentwali totali billi tuża l-ekwazzjoni [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Ekwazzjoni [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Ekwazzjoni [11]}$$

fejn:

D_h = il-bijodegradazzjoni mill-gass tal-ispazju vojt fuqani (%);

D_t = il-bijodegradazzjoni totali (%);

m_h, m_v u m_t huma kif iddefiniti iktar 'il fuq.

Il-grad ta' bijodegradazzjoni primarja huwa kkalkolat mill-kejliet (mhux obbligatorji) tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fi tmiem l-inkubazzjoni, bl-użu tal-ekwazzjoni [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Ekwazzjoni [12]}$$

fejn:

D_p = id-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test (%);

S_i = il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza tat-test (mg/l);

S_e = il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fi tmiem (mg/l).

Jekk il-metodu ta' analiżi jindika konċentrazzjonijiet sinifikanti tas-sustanza tat-test fl-inokulu tal-ħama anaerobika mhux emendat, uża l-ekwazzjoni [13]:

▼M6

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Ekwazzjoni [13]}$$

fejn:

D_p^1 = id-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test (%);

S_{ib} = il-konċentrazzjoni inizjali "apparenti" tas-sustanza tat-test fil-kontrolli inbjank (mg/l);

S_{eb} = il-konċentrazzjoni "apparenti" tas-sustanza tat-test fil-kontrolli inbjank fi tmiem (mg/l).

Validità tar-riżultati

50. Il-qari tal-pressjoni għandu jintuża biss minn reċipjenti li ma jurux tilwin roża (ara l-paragrafu 33). Il-kontaminazzjoni bl-ossiġenu tiġi minimizzata bl-użu ta' tekniki xierqa ta' tqandil anaerobiku.

51. Għandu jiġi kkunsidrat li t-test huwa validu jekk is-sustanza ta' referenza tilħaq plateau li tirrappreżenta bijodegradazzjoni ta' iktar minn 60 % ([1]).

52. Jekk il-pH fi tmiem it-test tkun qabżet il-medda ta' 7 ± 1 u tkun seħħet bijodegradazzjoni insuffiċjenti, irrepeti t-test b'kapaċità ikbar ta' bafer tal-midjum.

Inibizzjoni tad-degradazzjoni

53. Il-produzzjoni tal-gass f'reċipjenti li fihom kemm is-sustanza tat-test kif ukoll dik ta' referenza għandha tkun tal-inqas daqs dik fir-reċipjenti li fihom biss sustanza ta' referenza; inkella tiġi indikata l-inibizzjoni tal-produzzjoni tal-gass. F'ċerti każijiet, il-produzzjoni tal-gass f'reċipjenti li fihom is-sustanza tat-test mingħajr is-sustanza ta' referenza tkun inqas minn dik fil-kontrolli inbjank, u dan jindika li s-sustanza tat-test hija inibitorja.

Rapport tat-test

54. Ir-rapport tat-test irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

— l-isem komuni, isem is-sustanza kimika, in-numru tas-CAS, il-formula strutturali u l-karatteristiċi fiżikokimiċi relevanti;

— il-purità (impuritajiet) tas-sustanza tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-volumi ta' likur diġestitur dilwit (V_l) u tal-ispazju vojt fuqani (V_h) fir-reċipjent;

— deskrizzjoni tar-reċipjenti tat-test, il-karatteristiċi ewlenin tal-kejl tal-bijogass (eż. it-tip ta' apparat li jkejjel il-pressjoni) u tal-analizzatur tal-IC;

— l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza għas-sistema tat-test: il-konċentrazzjoni tat-test użata u kwalunkwe użu ta' solventi;

— dettalji dwar l-inokulu użat: l-isem tal-impjant ta' trattament tad-drenaġġ, deskrizzjoni tas-sors tal-ilma mormi ttrattat (eż. it-temperatura operazzjonali, il-ħin ta' żamma tal-ħama, predominanza domestika, eċċ.), il-konċentrazzjoni, kwalunkwe informazzjoni meħtieġa biex tiġi sostanzjata u informazzjoni dwar kwalunkwe pretrattament tal-inokulu (eż. prediġestjoni, preespożizzjoni);

— it-temperatura ta' inkubazzjoni;

— in-numru ta' rreplikati.

([1]) Dan għandu jerġa' jiġi evalwat jekk ikunu inklużi sustanzi kimiċi ta' referenza assobenti u insolubbli.

▼M6

Riżultati:

— il-pH u l-valuri tal-IC fi tmiem it-test;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test, jekk ikun sar kejl speċifiku.

— id-dejta kollha mkejla miġbura fis-sustanza tat-test, inbjank u ta' referenza u r-reċipjenti tal-kontroll ta' inibizzjoni, kif xieraq (eż. il-pressjoni f'millibars, il-konċentrazzjoni ta' karbonju inorganiku (mg/l)) f'forma tabulari (dejta mkejla għall-ispazju vojt fuqani u l-likwidu għandha tiġi rrapportata b'mod separat);

— it-trattament statistiku tad-dejta, id-durata tat-test u dijagramma tal-bijodegradazzjoni tas-sustanza tat-test, is-sustanza ta' referenza u l-kontroll tal-inibizzjoni;

— il-bijodegradazzjoni perċentwali tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza;

— ir-raġunijiet għal kwalunkwe rifjut tar-riżultati tat-test;

— diskussjoni tar-riżultati.

LETTERATURA

(1) Il-kapitoli li ġejjin ta' dan l-Anness:

C.4, Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità Lesta;

C.9, Bijodegradazzjoni — Test ta' Zahn-Wellens;

C.10, Test ta' Simulazzjoni — Trattament tad-Drenaġġ Aerobiku:

A: Unitajiet tal-Ħama Attivata, B: Bijofilms

C.11, Bijodegradazzjoni — Inibizzjoni tar-respirazzjoni tal-ħama attivata

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼**M6**

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.

(12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.

(13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

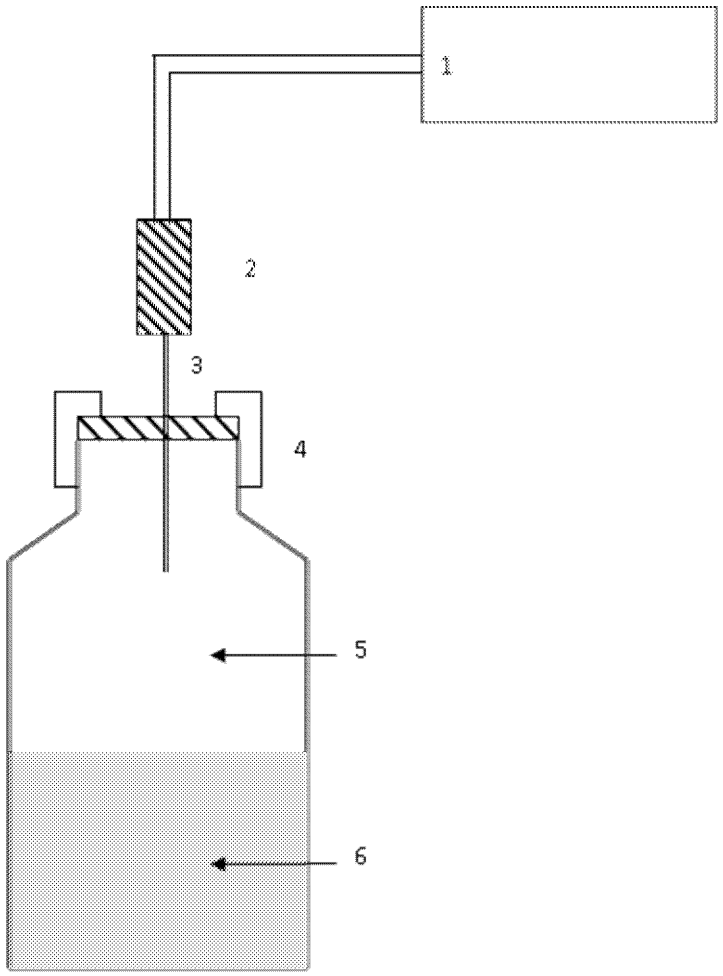
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Appendiċi 1

Eżempju ta' apparat li jkejjel il-produzzjoni tal-bijogass bil-pressjoni tal-gass



Leġġenda:

1 — Apparat li jkejjel il-pressjoni

2 — Valv issiġillat għall-gass tridirezzjonali

3 — Labra tas-siringa

4 — Siġill impermeabbli għall-gass (għatu kkrimpjat u septum)

5 — Spazju fil-wiċċ (V_h)

6 — Inokulu ta' ħama diġerita (V_l)

Reċipjenti tat-test f'ambjent ta' 35 °C ± 2 °C

▼M6

Appendiċi 2

Konverżjoni tal-apparat li jkejjel il-pressjoni

Il-qari tal-apparat li jkejjel il-pressjoni jista' jkun marbut mal-volumi tal-gass peremzz ta' kurva standard prodotta bl-injezzjoni ta' volumi magħrufin ta' arja ta' 35 °C ± 2 °C fil-fliexken tas-serum li fihom volum ta' ilma daqs dak tat-taħlita tar-reazzjoni, V_R:

— Ferra' V_R ml alikwoti ta' ilma, miżmuma f'35 °C ± 2 °C f'ħames fliexken tas-serum. Issiġilla l-ilmijiet u qiegħedhom siegħa f'banjumarija 35 °C sabiex jekwilibraw;

— Ixgħel il-miter tal-pressjoni, ħallih jistabbilizza, u aġġusta għal żero;

— Daħħal il-labra tas-siringa minn ġos-siġill ta' wieħed mill-fliexken, iftaħ il-valv sakemm l-apparat li jkejjel il-pressjoni jaqra żero u agħlaq il-valv;

— Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;

— Injetta 1 ml arja f'35 °C ± 2 °C f'kull flixkun. Daħħal il-labra (fuq il-miter) mis-siġill ta' wieħed mill-fliexken u ħalli l-qari tal-pressjoni jistabbilizza. Irreġistra l-pressjoni, iftaħ il-valv sakemm il-pressjoni tinqara żero u mbagħad agħlaq il-valv;

— Irrepeti l-proċedura għall-fliexken li jfidal;

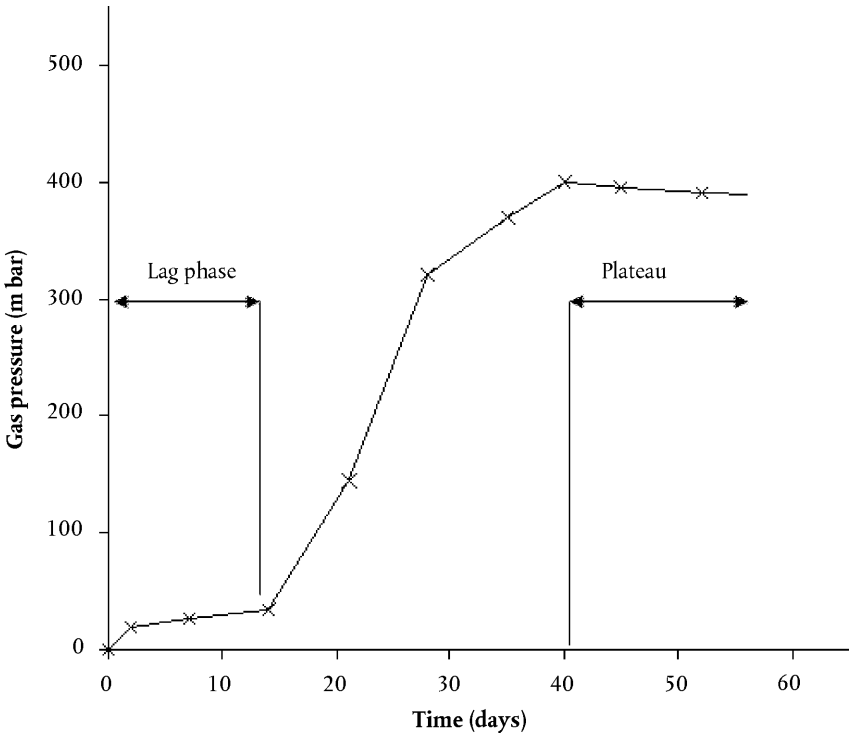
— Irrepeti l-proċedura sħiħa ta' hawn fuq billi tuża 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml u 50 ml arja;

— Ipplottja kurva tal-konverżjoni tal-pressjoni (Pa) kontra l-volum ta' gass injettat Vb (ml). Ir-rispons tal-istrument huwa lineari tul il-medda bejn 0 Pa sa 70 000 Pa, u 0 ml sa 50 ml tal-produzzjoni tal-gass.

▼**M6**

Appendiċi 3

Eżempju ta' kurva ta' degradazzjoni (żieda fil-pressjoni netta kumulattiva)



▼M6

Appendiċi 4

Eżempju ta' skedi ta' dejta għat-test ta' bijodegradazzjoni anaerobika — skeda ta' dejta għas-sustanza tat-test

Laboratorju: ..... Sustanza tat-test: ..... Nru tat-Test: .....

Temperatura tat-test: (°C): ..... Volum tal-ispazju vojt fuqani (V_h): .....(l) Volum ta' likwidu (V_l): .....(l)

Karbonju fis-sustanza tal-ittestjar $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v ([1]): .....(mg)

Jum	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) medja (mbar)	p_4 (inbjank) (mbar)	p_5 (inbjank) (mbar)	p_6 (inbjank) (mbar)	p (inbjank) medja (mbar)	p (nett) test — inbjank medja (mbar)	Δp (nett) Kumulattiv (mbar)	m_h C fl-ispazju vojt fuqani ([2]) (mg)	D_h Bijodegradazzjoni ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ test (mg)	$C_{IC,\ 2}$ test (mg)	$C_{IC,\ 3}$ test (mg)	C_{IC} medja tat-test (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inbjank (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inbjank (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inbjank (mg)	C_{IC} medja inbjank (mg)	$C_{IC,\ net}$ test -inbjank medja (mg)	m_l C fil-likwidu ([4]) (mg)	m_t C totali ([5]) (mg)	D_t Bijodegradazzjoni ([6]) (%)
IC (tmiem)												
pH (tmiem)												

([1]) Karbonju fir-reċipjent tal-ittestjar, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Karbonju fl-ispazju vojt fuqani, m_h (mg) f'temperatura ta' inkubazzjoni normali (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Bijodegradazzjoni kkalkolata mill-gass tal-ispazju vojt fuqani, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

([4]) Karbonju fil-likwidu, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

([5]) Karbonju gassifikat totali, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Bijodegradazzjoni totali, D_t (%): $Dt = (m_t \times 100)/m_v$

▼M6

Laboratorju: ..... Sustanza ta' referenza: ..... Nru tat-test: .....

Temperatura tat-test: (°C): ..... Volum tal-ispazju vojt fuqani (V_h): .....(l) Volum ta' likwidu (V_l) (litri): .....

Karbonju fis-sustanza ta' referenza $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg): .....

Jum	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) medja (mbar)	p_4 (inib.) (mbar)	p_5 (inib.) (mbar)	p_6 (inib.) (mbar)	p (inib.) medja (mbar)	p (ref.) ref. — inbjank (mbar)	Δp (ref.) kumulattiv (mbar)	m_h C fl-ispazju vojt fuqani ([2]) (mg)	D_h Bijodegradazzjoni ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} medja tar-ref. (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inib. (mg)	C_{IC} medja ta' inib. (mg)	$C_{IC,\ net}$ ref. — inib. (mg)	m_l C fil-likwidu ([4]) (mg)	m_t C totali ([5]) (mg)	D_t Bijodegradazzjoni ([6]) (%)
IC (tmiem)												
pH (tmiem)												

([1]) Karbonju fir-reċipjent tal-ittestjar, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Karbonju fl-ispazju vojt fuqani, m_h (mg) f'temperatura ta' inkubazzjoni normali (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Bijodegradazzjoni kkalkolata mill-gass tal-ispazju vojt fuqani, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

([4]) Karbonju fil-likwidu, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

([5]) Karbonju gassifikat totali, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Bijodegradazzjoni totali, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

C.44. LISSIJA F'KOLONNI TAL-ĦAMRIJA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 312 tal-OECD (2004). Is-sustanzi kimiċi magħmulin mill-bniedem jistgħu jaslu fil-ħamrija direttament permezz ta' applikazzjoni deliberata (eż. agrikimiki) jew permezz ta' rotot indiretti (eż. permezz ta' ilma mormi → ħama tad-drenaġġ → ħamrija jew arja → depożitu mxarrab/xott). Għal valutazzjoni tar-riskju ta' dawn is-sustanzi kimiċi, importanti li jiġi stmat il-potenzjal tagħhom li jittrasformaw f'ħamrija u għal ċaqliq (lissija) f'saffi iktar fondi tal-ħamrija u eventwalment f'ilma ta' taħt l-art.

2. Hemm bosta metodi għad-dispożizzjoni sabiex jitkejjel il-potenzjal ta' lissija tas-sustanzi kimiċi fil-ħamrija f'kundizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati, jiġifieri kromatografija b'saff baxx tal-ħamrija, kromatografija b'saff għoli tal-ħamrija, kromatografija tal-kolonna tal-ħamrija, u kejliet tal-assorbiment — disorbiment (1) (2). Għal sustanzi kimiċi mhux jonizzati, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-n-ottanol-ilma (P_{ow}) jippermetti li tinħareġ stima bikrija tal-potenzjal ta' assorbiment u lissija tagħhom (3)(4)(5).

3. Il-metodu deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq kromatografija tal-kolonna tal-ħamrija fil-ħamrija disturbata (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni). Isiru żewġ tipi ta' esperimenti sabiex jiġu stabbiliti (i) il-potenzjal ta' lissija tas-sustanza kimika tat-test, u (ii) il-potenzjal ta' lissija tal-prodotti ta' trasformazzjoni (studju b'residwi li tħallew jiqdiemu) f'ħamrija f'kundizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati ([1]). Il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq metodi eżistenti (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. F'sessjoni ta' ħidma tal-OECD dwar l-għażla tal-ħamrija/in-naqal, li saret f'Belgirate, l-Italja, fl-1995 (12) intlaħaq qbil fuq in-numru u t-tipi ta' ħamrija li għandhom jintużaw f'dan il-metodu ta' ttestjar. Saru wkoll rakkomandazzjonijiet dwar it-teħid, it-tqandil u l-ħżin tal-kampjuni tal-ħamrija għall-esperimenti tal-lissija.

PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

5. Kolonni magħmulin minn materjal inerti xieraq (eż. ħġieġ, azzar inossidabbli, aluminju, teflon, PVC, eċċ.) huma ppakkjati bil-ħamrija u wara jiġu saturati u ekwilibrati b'soluzzjoni ta' "xita artifiċjali" (għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 1) u titħalla titbattal. Imbagħad, il-wiċċ ta' kull kolonna jiġi ttrattat bis-sustanza kimika tat-test u/jew b'residwi li jitħallew jiqdiemu tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad tiġi applikata xita artifiċjali għall-kolonni tal-ħamrija u tinġabar il-lissija. Wara l-proċess ta' lissija, il-ħamrija titneħħa mill-kolonni u titqassam f'numru xieraq ta' segmenti skont l-informazzjoni meħtieġa mill-istudju. Imbagħad, kull segment tal-ħamrija u l-lissija jiġu analizzati għas-sustanza kimika tat-test u, jekk xieraq, għall-prodotti ta' trasformazzjoni jew sustanzi kimiċi oħrajn ta' interess.

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi tat-test (mhux ittikketti jew radjutikkettati: eż. ^{14}C) li għalihom hemm disponibbli metodu analitiku bi preċiżjoni u sensittività suffiċjenti. Il-metodu ta' ttestjar għandu jiġi applikat għas-sustanzi kimiċi li huma volatili mill-ħamrija u l-ilma u b'hekk ma jibqgux fil-ħamrija u/jew lissija fil-kundizzjonijiet sperimentali ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Sustanzi kimiċi tat-test mhux ittikketti jew radjutikkettati jistgħu jintużaw sabiex titkejjel l-imġiba tal-lissija fil-kolonni tal-ħamrija. Materjal radjutikkettat huwa meħtieġ sabiex tiġi studjata l-lissija tal-prodotti ta' trasformazzjoni

([1]) L-istudji ta' lixxivjazzjoni tal-kolonna bi prodotti għall-protezzjoni tal-għelejjel jistgħu jipprovdu informazzjoni dwar il-mobilità dwar sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha u jistgħu jissuplimentaw studji dwar is-sorbiment tal-lott.

▼**M6**

(residwi li jitħallew jiqdiemu tas-sustanza kimika tat-test) u għad-determinazzjonijiet tal-bilanċ tal-massa.^{14}C-tikkettar huwa rrakkomandat iżda isotopi oħrajn, bħal ^{13}C,^{15}N,^{3}H,^{32}P, jistgħu jkunu siewja. Kemm jista' jkun, it-tikketta għandha titqiegħed fl-iktar parti(jiet) stabbli tal-molekola. Il-purità tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun tal-inqas 95 %.

8. Ħafna mis-sustanzi kimiċi għandhom jiġu applikati bħala sustanza waħda. Madankollu, għal sustanzi attivi fil-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, jistgħu jintużaw prodotti fformulati sabiex tiġi studjata l-lissija tas-sustanza tat-test prinċipali iżda l-ittestjar tagħhom huwa meħtieġ b'mod partikolari meta t-taħlita jkollha probabbiltà li taffettwa r-rata ta' ħlus (eż. formulazzjonijiet bi ħlus ikkontrollat jew granulari). Rigward rekwiżiti speċifiċi għat-taħlita għad-disinn tat-test, jista' jkun siewi li tiġi kkonsultata l-awtorità regolatorja qabel ma jsir it-test. Għal studji dwar il-lissija tar-residwu li jitħalla jiqdiem, għandha tintuża s-sustanza tat-test prinċipali pura.

9. Qabel ma jsiru testijiet tal-lissija fil-kolonni tal-ħamrija, idealment għandu jkun hemm disponibbli l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza kimika tat-test:

(1) [il-metodu ta' ttestjar A.6] tas-solubilità fl-ilma (13);

(2) is-solubilità f'solventi organiċi;

(3) [il-metodu ta' ttestjar A.4] tal-pressjoni tal-fwar (13) u l-kostanti tal-Liġi ta' Henry;

(4) [il-metodi ta' ttestjar A.8 u A.24] tal-koeffiċjent ta' partizzjoni n-ottanol/ilma (13);

(5) il-metodi ta' ttestjar C.18 u/jew C.19 tal-koeffiċjent ta' assorbiment (K_d, K_f or K_{OC}) (13);

(6) idroliżi [metodu ta' ttestjar C.7] (13);

(7) kostanti ta' dissoċjazzjoni (pK_a) [OECD TG 112] (25);

(8) trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-ħamrija [metodu ta' ttestjar C.23] (13)

Nota: It-temperatura li fiha saru dawn il-kejliet għandha tiġi rrapportata fir-rapporti tat-test rispettivi.

10. L-ammont tas-sustanza kimika applikata għall-kolonni tal-ħamrija għandu jkun biżżejjed biex tal-inqas tkun tista' tiġi identifikata 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment. Għal sustanzi kimiċi attivi fi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, l-ammont tas-sustanza kimika tat-test applikat jista' jikkorrispondi għar-rata massima rakkomandata ta' użu (applikazzjoni waħda).

11. Irid ikun hemm disponibbli metodu analitiku xieraq b'reqqa, preċiżjoni u sensittività maġħrufin għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u, jekk relevanti, tal-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha fil-ħamrija u l-lissija. Il-limitu ta' detezzjoni analitika għas-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni sinifikanti tagħha (normalment tal-inqas il-prodotti ta' trasformazzjoni kollha ≥ 10 % tad-doża applikata osservata fl-istudji tal-passaġġ tat-trasformazzjoni, iżda idealment kwalunkwe prodott ta' trasformazzjoni ta' tħassib) għandu jkun maġħruf ukoll (ara l-paragrafu 17).

▼M6

SUSTANZI KIMIĊI TA' REFERENZA

12. Sustanzi kimiċi ta' referenza b'imġiba ta' lissija magħrufa bħal atrażina jew monuron li jistgħu jitqiesu bħala lissiji moderati fl-għalqa għandhom jintużaw għall-evalwazzjoni tal-mobilità relattiva tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija (1)(8)(11). Sustanza kimika ta' referenza polari mhux sorbenti u mhux degradabbli (eż. titrju, bromur, fluworosseina, eożina) sabiex jiġi traċċat il-moviment tal-ilma fil-kolonna jista' jkun siewi wkoll sabiex jiġu kkonfermati l-karatteristiċi idrodinamiċi fil-kolonna tal-ħamrija.

13. Is-sustanzi kimiċi standard analitiċi jistgħu jkunu siewja wkoll għall-karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni misjubin fis-segmenti tal-ħamrija u fil-lissiji permezz ta' metodi kromatografiċi, spettroskopiċi jew oħrajn relevanti.

DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

14. Ara l-Appendiċi 1.

KRITERJI TAL-KWALITÀ

Irkupru

15. Is-somma tal-perċentwali tas-sustanza kimika tat-test misjuba fis-segmenti tal-ħamrija u l-lissija tal-kolonna wara li l-lissija tagħti l-irkupru għal esperiment tal-lissija. L-irkupri għandhom ivarjaw minn 90 % sa 110 % għal sustanzi kimiċi radjutikkettati (11) u minn 70 % sa 110 % għal sustanzi kimiċi mhux ittikkettati (8).

Repetibilità u sensittività tal-metodu analitiku

16. Ir-repetibilità tal-metodu analitiku sabiex jiġu kkwantifikati s-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tista' tiġi vverifikata b'analiżi tad-duplikat tal-istess estratt ta' segment tal-ħamrija jew ta' lissija (ara l-paragrafu 11).

17. Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) tal-metodu analitiku għas-sustanza kimika tat-test u għall-prodotti ta' trasformazzjoni għandu jkun tal-inqas 0,01 mg $\cdot$ kg^{-1} f'kull segment tal-ħamrija jew lissija (bħala sustanza kimika tat-test) jew 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment wieħed li jkun l-inqas. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) għandu jkun speċifikat ukoll.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Sistema ta' ttestjar

18. Għat-test jintużaw kolonni ta' lissija (li jistgħu jinqatgħu jew le) magħmulin minn materjal inerti kif xieraq (eż. ħġieġ, azzar inossidabbli, aluminju, teflon, PVC, eċċ.) b'dijametru intern ta' tal-inqas 4 cm u għoli minimu ta' 35 cm. Il-materjali tal-kolonni għandhom jiġu ttestjati għal interazzjonijiet potenzjali mas-sustanza kimika tat-test u/jew il-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha. Eżempji ta' kolonni li jistgħu jinqatgħu u dawk li ma jistgħux jinqatgħu jintwerew fl-Appendiċi 2.

19. Għall-mili u l-impakkettar tal-kolonni tal-ħamrija jintużaw mgħarfa, pompa u apparat tal-vibrazzjoni.

20. Għall-applikazzjoni tax-xita artifiċjali għall-kolonni tal-ħamrija, jistgħu jintużaw pompi peristaltiċi jew bil-pistuni, showering heads, fliexken Mariotte jew sempliċi lenbut bi fluss kontrollat.

▼M6

Tagħmir tal-laboratorju u sustanzi kimiċi

21. Huwa meħtieġ tagħmir standard tal-laboratorju, b'mod partikolari dan li ġej:

(1) strumenti analitiċi bħal tagħmir tal-GLC, HPLC u TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' detezzjoni għall-analiżi tas-sustanzi kimiċi ttikkettati jew mhux ittikkettati jew metodu ta' dilwizzjoni tal-isotopi inversi;

(2) strumenti għal skopijiet ta' identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);

(3) kontatur tax-xintillar likwidu għal sustanza kimika tat-test radjuttikkettata;

(4) ossidizzant għall-kombustjoni ta' materjal ittikkettat;

(5) apparat ta' estrazzjoni (pereżempju, tubi ta' ċentrifugi għal estrazzjoni fil-kesħa u apparat Soxhlet għal estrazzjoni kontinwa taħt rifluss);

(6) strumentazzjoni għall-konċentrazzjoni ta' soluzzjonijiet u estratti (eż. evaporatur rotanti).

22. Is-sustanzi kimiċi użati jinkludu: solventi, grad analitiku, bħal aċetun, metanol, eċċ.; xintillar likwidu; soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$ f'ilma distillat jew dejonizzat (= xita artifiċjali).

Sustanza kimika tat-test

23. Biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test għall-kolonna tal-ħamrija, din għandha tiġi dissolta fl-ilma (dejonizzata jew distillata). Jekk is-sustanza kimika tat-test ftit li xejn hija solubbli fl-ilma, tista' tiġi applikata jew bħala prodott ifformulat (jekk hemm bżonn wara sospensjoni jew emulsifikazzjoni fl-ilma) jew f'xi solvent organiku. F'każ li jintuża solvent organiku, għandu jinżamm għall-minimu u għandu jiġi evaporat mill-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija qabel ma tinbeda l-proċedura ta' lissija. Formulazzjonijiet solidi, bħal granuli, għandhom jiġu applikati fil-forma solida mingħajr ilma; biex tkun tista' ssir distribuzzjoni aħjar tul il-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija, il-prodott ifformulat jista' jitħallat ma' ammont żgħir ta' ramel kwarzuż (eż. 1 g) qabel l-applikazzjoni.

24. L-ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-kolonni tal-ħamrija għandu jkun biżżejjed sabiex tkun tista' tiġi identifikata 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment. Għal sustanzi attivi fi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, dan jista' jkun ibbażat fuq rata ta' użu massima rrakkomandata (rata ta' applikazzjoni unika) u, kemm għal lissija prinċipali u li tħalliet tiqdiem, għandu jkun marbut mal-erja tas-superfiċje tal-kolonna tal-ħamrija użata ([1]).

Sustanza kimika ta' referenza

25. Għandha tintuża sustanza kimika ta' referenza fl-esperimenti tal-lissija (ara l-paragrafu 12). Għandha tiġi applikata għall-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija b'mod simili bħas-sustanza kimika tat-test u b'rata xierqa li tippermetti detezzjoni

([1]) L-ammont li jrid jiġi applikat għall-kolonni tal-ħamrija ċilindrika jista' jiġi kkalkolat bil-formula li ġejja:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

fejn:

M = l-ammont applikat għal kull kolonna [µg]

A = ir-rata ta' applikazzjoni [$kg \cdot ha^{-1}$]

d = id-dijametru tal-kolonna tal-ħamrija [cm]

π = 3,14

▼M6

adegwata jew bħala standard intern flimkien mas-sustanza kimika tat-test fuq l-istess kolonna tal-ħamrija jew inkella waħedha fuq kolonna tal-ħamrija separata. Idealment iż-żewġ sustanzi kimiċi jiġu applikati fuq l-istess kolonna, għajr meta ż-żewġ sustanzi kimiċi jkunu ttikkettati b'mod simili.

Ħamrija

Għażla tal-ħamrija

26. Għal studji dwar il-lissija bis-sustanza kimika tat-test prinċipali għandhom jintużaw 3 sa 4 ħamrija b'pH, kontenut ta' karbonju organiku u sawra varjanti (12). Fit-Tabella 1 ta' hawn taħt tingħata gwida għall-għażla ta' ħamrija għall-esperimenti ta' lissija. Għal sustanzi kimiċi tat-test jonizzabbli, il-ħamrija magħżulin għandhom ikopru firxa wiesgħa ta' pH, sabiex tiġi evalwata l-mobilità tas-sustanza kimika fil-forom jonizzati u mhux jonizzati tagħha; tal-inqas 3 ħamrija għandu jkollhom pH li fiha s-sustanza kimika tat-test tkun fil-forma mobbli tagħha.

Tabella 1

Gwida għall-għażla ta' ħamrija għal studji dwar il-lissija

Nru tal-Ħamrija	Valur tal-pH	Karbonju organiku %	Kontenut ta' tafal %	Sawra (*)
1	> 7,5	3,5 — 5,0	20 — 40	lom tat-tafal
2	5,5 — 7,0	1,5 — 3,0	15 — 25	lom tal-fajd
3	4,0 — 5,5	3,0 — 4,0	15 — 30	lom
4	< 4,0 — 6,0 §	< 0,5 — 1,5 § ‡	< 10 — 15 §	ramel grass
5	< 4,5	> 10 #	< 10	ramel grass/ramel

(*) Skont is-sistemi tal-FAO u l-USDA (14).

§ Idealment, il-varjabbli rispettivi għandhom juru valuri li jaqgħu fi ħdan il-medda mogħtija. Madankollu, jekk ikun ħemm diffikultajiet fis-sejbien tal-materjal tal-ħamrija xieraq, jiġu aċċettati valuri inqas mill-minimu indikat.

‡ Ħamrija b'karbonju organiku ta' inqas minn 0,3 % jistgħu jxekklu l-korrelazzjoni bejn kontenut organiku u assorbiment. B'ħekk, huwa rrakkomandat li jintużaw ħamrija b'kontenut minimu ta' karbonju organiku ta' 0,3 %.

Ħamrija b'kontenut ta' karbonju għoli ħafna (eż. > 10 %) jaf ma jkunux legalment aċċettabbli eż. għal finijiet ta' reġistrazzjoni tal-pestiċidi.

27. Kultant jistgħu jkunu meħtieġa tipi oħrajn ta' ħamrija sabiex jirrappreżentaw reġjuni iktar kiesħin, sħan u tropikali. Għaldaqstant, jekk ikunu ppreferiti tipi oħrajn ta' ħamrija, għandhom jiġu kkaratterizzati bl-istess parametri u għandu jkollhom varjazzjonijiet simili bħal dawk deskritti fil-gwida għall-għażla tal-ħamrija għal studji dwar il-lissija (ara t-Tabella 1 iktar 'il fuq), anki jekk ma jkunux jaqblu mal-kriterji bl-eżatt.

28. Għall-istudji dwar il-lissija b'"residwi li tħallew jiqdiemu", għandha tintuża ħamrija waħda (12). Għandu jkollha kontenut ta' ramel ta' > 70 % u kontenut ta' karbonju organiku ta' bejn 0,5 — 1,5 % (eż. Nru tal-ħamrija 4 fit-Tabella 1). Jista' jkun ħemm bżonn li jintużaw iktar minn tip wieħed ta' ħamrija jekk id-dejta dwar il-prodotti ta' trasformazzjoni tkun importanti.

29. Il-ħamrija kollha għandhom ikunu kkaratterizzati tal-inqas għas-sawra [% ramel, % fajd, % tafal skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-FAO u l-USDA (14)], il-pH, il-kapaċità ta' skambju ta' katjoni, il-kontenut ta' karbonju organiku, id-densità grossa (għal ħamrija disturbata) u l-kapaċità

▼M6

ta' felħan ta' ilma. Il-kejl tal-bijomassa mikrobjali huwa meħtieġ biss għall-ħamrija li tintuża fil-perjodu ta' inkubazzjoni/li fih titħalla tiqdiem imwettaq wara l-esperiment ta' lissija li titħalla titqdiem. Informazzjoni dwar karatteristiċi addizzjonali tal-ħamrija (eż. klassifikazzjoni tal-ħamrija, mineraloġija tat-tafal, erja tas-superfiċje speċifika) tista' tkun siewja sabiex jiġu interpretati r-riżultati ta' dan l-istudju. Sabiex jiġu stabbiliti l-karatteristiċi tal-ħamrija, jistgħu jintużaw il-metodu rrakkomandati fir-referenzi (15)(16)(17)(18)(19).

Il-ġbir u l-ħżin tal-ħamrija

30. Il-ħamrija għandhom jittieħdu mis-saff ta' fuq (orizzont-A) sa fond massimu ta' 20 cm. Il-fdalijiet ta' veġetazzjoni, makrofawna u iġbla għandhom jitneħħew. Il-ħamrija (ħlief dawk użati biex is-sustanza kimika tat-test titħalla tiqdiem) jitnixxu bl-arja f'temperatura tal-kamra (idealment bejn 20-25 °C). Id-disaggregazzjoni għandha ssir b'saħħa minima, sabiex is-sawra orġinali tal-ħamrija tinbidel bl-inqas mod possibbli. Il-ħamrija huma mgħarbula minn passatur ta' ≤ 2 mm. Hija rrakkomandata omoġenizzazzjoni bir-reqqa, peress li din issaħħaħ ir-riproduċibilità tar-riżultati. Qabel ma jintużaw, il-ħamrija jistgħu jinħażnu f'temperatura ambjentali u jitnixxfu bl-arja (12). Ma huwa rrakkomandat ebda limitu iżda l-ħamrija maħżunin għal iktar minn 3 snin għandhom jerġgħu jiġu analizzati qabel ma jintużaw fir-rigward tal-kontenut ta' karbonju organiku u l-pH tagħhom.

31. Għandu jkun hemm għad-dispożizzjoni informazzjoni ddettaljata dwar l-istorja tas-siti tal-għelieqi mnejn jinġabru l-ħamrija tat-test. Id-dettalji jinkludu l-post eżatt [iddefiniti bl-eżatt mill-UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) jew il-koordinati ġeografiċi], il-kopertura tal-veġetazzjoni, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u inorganiċi, żidiet ta' materjali bijoloġiċi jew kontaminazzjoni inċidentali (12). Jekk il-ħamrija tiġi ttrattata bis-sustanza kimika tat-test jew l-analogi strutturali tagħha fl-erba' snin ta' qabel, dawn il-ħamrija ma għandhomx jintużaw għal studji dwar il-lissija.

Kundizzjonijiet tat-test

32. Matul il-perjodu ta' ttestjar, il-kolonni ta' lissija tal-ħamrija għandhom jinżammu fid-dlam f'temperatura ambjentali sakemm din it-temperatura tinżamm fi ħdan il-medda ta' ± 2 °C. It-temperaturi rrakkomandati huma ta' bejn 18 u 25 °C.

33. Għandha tiġi applikata xita artifiċjali (0,01 M $CaCl_2$) kontinwament fuq wiċċ il-kolonni tal-ħamrija b'rata ta' 200 mm tul perjodu ta' 48 siegħa ([1]); din ir-rata hija ekwivalenti għal applikazzjoni ta' 251 għal kolonna b'dijametru intern ta' 4 cm. Jekk ikunu meħtieġa għall-fini tat-test, jistgħu jintużaw ukoll rati oħrajn ta' xita artifiċjali u ta' durata itwal.

Twettiq tat-test

Lissija b'sustanza kimika tat-test prinċipali

34. Tal-inqas, kolonni ta' lissija ta' duplikati jiġu mpakkettati b'ħamrija mhux ittrattata, imnixxfa bl-arja u mgħarbula (< 2 mm) b'għoli li jasal sa madwar 30 cm. Biex jinkiseb ippakkjar uniformi, il-ħamrija tiddaħħal fil-kolonni f'porzjonijiet żgħar b'imgħarfa u titniżżel 'l isfel b'pompa b'vibrazzjoni simultanja ħafifa tal-kolonna sakemm il-quċċata tal-kolonna tal-ħamrija ma tinżilx iktar. L-ippakkjar uniformi huwa meħtieġ sabiex jinkisbu riżultati riproduċibbli minn kolonni ta' lissija. Għal dettalji dwar tekniki ta' ppakkettjar

([1]) Dan jissimula ammont kbir ta' xita. Ix-xita annwali medja, pereżempju, fl-Ewropa Ċentrali, hija fl-ordni ta' 800-1 000 mm.

▼M6

tal-kolonni, ara r-referenzi (20)(21) u (22). Biex tiġi kkontrollata r-riproduċibilità tal-proċedura ta' ppakkjar, jiġi stabbilit il-piż sħiħ tal-ħamrija ppakkjata fil-kolonni. ([1]); il-piżijiet tal-kolonni ta' duplikati għandhom ikunu simili.

35. Wara l-impakkettar, il-kolonni tal-ħamrija jixxarrbu minn qabel b'xita artifi-jali (0,01 M $CaCl_2$) mill-qiegħ sa fuq sabiex l-arja fil-pori tal-ħamrija tiġi spostata bl-ilma. Wara, il-kolonni tal-ħamrija jitħallew jekwilibraw u l-ilma żejjed jitbattal bil-gravità. Il-metodi għas-saturazzjoni tal-kolonni huma rive-duti fir-referenza (23).

36. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test u/jew is-sustanza kimika ta' referenza jiġu applikati għall-kolonni tal-ħamrija (ara wkoll il-paragrafi 23-25). Biex tinkiseb distribuzzjoni omoġena, is-soluzzjonijiet, is-sospensjonijiet jew l-emulsjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u/jew ta' referenza għandhom jiġu applikati ndaqs fuq il-wiċċ tal-kolonni tal-ħamrija. Jekk tkun irrakko-mandata inkorporazzjoni fil-ħamrija għall-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test, għandha titħallat f'ammont żgħir (eż. 20 g) ta' ħamrija u tiżdied fuq wiċċ il-kolonna tal-ħamrija.

37. Imbagħad l-uċuħ tal-kolonni tal-ħamrija jitgħattew b'disk tas-sinter tal-ħġieġ, perli tal-ħġieġ, filtri tal-fibra tal-ħġieġ jew karta filtru tonda biex ix-xita artifiċjali tiġi distribwita b'mod ekwu fuq il-wiċċ sħiħ u jiġi evitat milli jiġi disturbat il-wiċċ tal-ħamrija minħabba l-qtar tax-xita. Iktar ma jkun kbir id-dijametru tal-kolonna, iktar trid toqgħod attent fl-applikazzjoni tax-xita artifiċjali fuq il-kolonni tal-ħamrija sabiex tiġi żgurata distribuzzjoni ndaqs tax-xita artifiċjali fuq il-wiċċ tal-ħamrija. Imbagħad, ix-xita artifiċjali tiżdied mal-kolonni tal-ħamrija qatra, qatra bl-għajnuna ta' pistun jew pompa peristaltika jew lenbut bi fluss kontrollat. Idealment, il-lissiji għandhom jinġabru fi frazzjonijiet u l-volumi rispettivi tagħhom jiġu rreġistrati ([2]).

38. Wara l-lissija u wara li l-kolonni jitħallew jitbattlu, il-kolonni tal-ħamrija jitqassmu f'numru xieraq ta' segmenti skont l-informazzjoni meħtieġa mill-istudju, is-segmenti jiġu estrattati b'solventi xierqa jew taħlitiet ta' solventi u jiġu analizzati għas-sustanza kimika tat-test u, meta jkun xieraq, għal prodotti ta' trasformazzjoni, għar-radjuattività totali u għas-sustanza kimika ta' referenza. Il-lissiji jew il-frazzjonijiet tal-lissiji jiġu analizzati diret-tament jew wara l-estrazzjoni għall-istess prodotti. Meta tintuża sustanza kimika tat-test radjuttikkettata, għandhom jiġu identifikati l-frazzjonijiet kollha li fihom ≥ 10 % tar-radjuattività applikata.

Lissija b'residwi li jitħallew jiqdiemu

39. Ħamrija ġdida (mhux imnixxfa bl-arja qabel) tiġi ttrattata b'rata li tikkorris-pondi għall-erja tas-superfiċje tal-kolonni tal-ħamrija (ara l-paragrafu 24) bis-sustanza kimika tat-test radjutikkettata u inkubata f'kundizzjonijiet aero-biċi skont il-Metodu ta' Ttestjar C.23 (13). Il-perjodu ta' inkubazzjoni (li fih titħalla tiqdiem) għandu jkun twil biżżejjed biex jiġu prodotti ammonti sini-fikanti ta' prodotti ta' trasformazzjoni; huwa rrakkomandat perjodu li fih

([1]) Dawn li ġejjin huma eżempji ta' densitajiet bl-ingrossa għal ħamrija disturbati:għal ħamrija ramlija 1,66 g · ml^{-1}
għal ħamrija ramlija tal-lom 1,58 g · ml^{-1}
għal ħamrija tal-lom 1,17 g · ml^{-1}
għal ħamrija tal-fajd = 1,11 · g ml^{-1}

([2]) Il-volumi tipiċi tal-lissiji jvarjaw minn 230-260 ml li jikkorrispondu għal madwar 92-104 % tax-xita artifiċjali totali applikata (251 ml) meta jintużaw kolonni tal-ħamrija b'dijametru ta' 4 cm u tul ta' 30 cm.

▼M6

titħalla tiqdiem ta' nofs ħajja waħda tas-sustanza kimika tat-test ([1]), iżda ma għandux jaqbeż il-120 jum. Qabel il-lissija, il-ħamrija li titħalla tiqdiem tiġi analizzata għas-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha.

40. Il-kolonni ta' lissija huma ppakkjati sa għoli ta' 28 cm bl-istess ħamrija (iżda jitnixxfu bl-arja) kif użata fl-esperiment li fih titħalla tiqdiem kif deskritt fil-paragrafu 34 u l-piż totali tal-kolonni tal-ħamrija ppakkjati jiġi stabbilit ukoll. Imbagħad, il-kolonni tal-ħamrija jixxarrbu minn qabel kif spjegat fil-paragrafu 35.

41. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha jiġu applikati fuq wiċċ il-kolonni tal-ħamrija fil-forma ta' residwi tal-ħamrija li jitħallew jiqdiemu (ara l-paragrafu 39) bħala segment tal-ħamrija ta' 2 cm. Idealment, l-għoli totali tal-kolonni tal-ħamrija (ħamrija mhux ittrattata + ħamrija li titħalla tiqdiem) ma għandux jaqbeż it-30 cm (ara l-paragrafu 34).

42. Il-lissija ssir kif spjegat fil-paragrafu 37.

43. Wara l-lissija, is-segmenti tal-ħamrija u l-lissiji jiġu analizzati kif indikat fil-paragrafu 38 għas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha u r-radjuattività mhux estratta. Biex jiġi stabbilit kemm ir-residwu li jitħalla jiqdiem jinżamm fis-saff ta' fuq ta' 2 cm wara l-lissija, dan is-segment għandu jiġi analizzat għalih.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

44. L-ammonti tas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni, dawk mhux estrattabbli u, jekk inklużi, tas-sustanza kimika ta' referenza għandhom jingħataw f' % ta' doża inizjali applikata għal kull segment tal-ħamrija u frazzjoni tal-lissija. Għandha tingħata preżentazzjoni grafika għal kull kolonna billi jiġu plottjati l-perċentwali misjubin bħala funzjoni tal-fondi tal-ħamrija.

45. Meta sustanza kimika ta' referenza tkun inkluża f'dawn l-istudji dwar il-lissija tal-kolonna, il-lissija ta' sustanza kimika tista' tiġi evalwata fuq skala relattiva li tuża fatturi ta' mobilità relattiva (RMF; għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 3) (1)(11) li biha tkun tista' titqabbel dejta dwar il-lissija ta' bosta sustanzi kimiċi miksubin b'tipi ta' ħamrija differenti. Fl-Appendiċi 3 jingħataw eżempji ta' valuri tal-RMF għal firxa ta' sustanzi kimiċi għall-protezzjoni tal-uċuħ tar-raba'.

46. Stimi tal-K_{oc} (il-koeffiċjent ta' assorbiment normalizzat għall-karbonju organiku) u l-K_{om} (koeffiċjent ta' distribuzzjoni normalizzat għall-materja organika) jistgħu jinkisbu wkoll mir-riżultati ta' lissija tal-kolonna bl-użu ta' distanza medja ta' lissija jew korrelazzjonijiet stabbiliti bejn l-RMF u l-K_{om} rispettivament K_{oc} (4) jew bl-applikazzjoni ta' sempliċi teorija ta' kromatografika (24). **Madankollu, l-aħħar metodu għandu jintuża bil-galbu, speċjalment meta jitqies li l-proċess ta' lissija ma jinvolvix biss kundizzjonijiet ta' fluss saturati, iżda anki sistemi mhux saturati.**

([1]) Jista' jiġi fformat prodott wieħed kbir ta' trasformazzjoni f'ħamrija li anki din tista' tidher f'punti ta' żmien differenti matul studju ta' trasformazzjoni. F'dawn il-każijiet, jista' jkun hemm bżonn li jsiru studji dwar il-lixxivjazzjoni b'residwi li tħallew jiqdiemu għal żminijiet differenti.

▼M6

Interpretazzjoni tar-riżultati

47. L-istudji dwar il-lissija tal-kolonna deskritti f'dan il-metodu jippermettu sabiex jiġi stabbilit il-potenzjal ta' lissija jew mobilità fil-ħamrija tas-sustanza kimika tat-test (fl-istudju dwar il-lissija prinċipali) u/jew il-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha (fl-istudju dwar il-lissija tar-residwu li jitħalla jiqdiem). Dawn it-testijiet ma jbassrux b'mod kwantitattiv l-imġiba ta' lissija fil-kundizzjonijiet tal-għalqa, iżda jistgħu jintużaw biex iqabblu l-"lixxivjabbiltà" ta' sustanza kimika ma' oħrajn b'imġiba ta' lissija li jaf tkun magħrufa (24). Lanqas ma jkejlu b'mod kwantitattiv il-perċentwal tas-sustanza kimika applikata li tista' tilħaq l-ilma ta' taħt l-art (11). Madankollu, ir-riżultati tal-istudji dwar il-lissija tal-kolonna jistgħu jgħinu biex jiġi deċiż jekk iridx isir ittestjar addizzjonali ta' nofs l-għalqa jew tal-għalqa mwettaq għal sustanzi kimiċi b'potenzjal kbir ta' mobilità f'testijiet tal-laboratorju.

Rapport tat-test

48. Ir-rapport irid jinkludi:

Sustanza kimika tat-test u sustanza kimika ta' referenza (meta tintuża):

— l-isem komuni, l-isem tas-sustanza kimika (nomenklatura tas-CAS u l-IUPAC), in-numru tas-CAS, l-istruttura kimika (inkluża l-pożizzjoni tat-tikketta meta jintuża materjal radjutikkettat) u l-karatteristiċi fiżikokimiċi relevanti;

— il-puritajiet (impuritajiet) tas-sustanza kimika tat-test;

— il-purità radjukimika tas-sustanza kimika ttikkettata u l-attività speċifika (fejn xieraq).

Ħamrija tat-test:

— dettalji dwar il-post tal-ġbir;

— il-karatteristiċi tal-ħamrija, bħall-pH, il-karbonju organiku u l-kontenut ta' tafal, is-sawra u d-densità bl-ingrossa (għal ħamrija disturbata);

— l-attività mikrobjali tal-ħamrija (iżda biss għal ħamrija użata sabiex is-sustanza kimika tat-test titħalla tiqdiem);

— it-tul tal-ħżin tal-ħamrija u l-kundizzjonijiet ta' ħżin tagħha.

Kundizzjonijiet tat-test:

— id-dati ta' meta saru l-istudji;

— it-tul u d-dijametru tal-kolonni ta' lissija;

— il-piż totali tal-ħamrija tal-kolonni tal-ħamrija;

— l-ammont tas-sustanza kimika tat-test u, jekk xieraq, is-sustanza kimika ta' referenza applikata;

— l-ammont, il-frekwenza u d-durata tal-applikazzjoni tax-xita artifiċjali;

— it-temperatura tas-sistema tal-esperiment;

— in-numru ta' rreplikati (tal-inqas tnejn);

— il-metodi għall-analiżi tas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni u, fejn xieraq, tas-sustanza kimika ta' referenza fil-bosta segmenti u lissiji tal-ħamrija;

— il-metodi għall-karatterizzazzjoni u l-identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni fis-segmenti tal-ħamrija u l-lissiji.

▼**M6**

Riżultati tat-test:

— it-tabelli tar-riżultati mogħtijin bħala konċentrazzjonijiet u bħala % tad-doża applikata għas-segmenti u l-lissiji tal-ħamrija;

— il-bilanċ tal-massa, jekk xieraq;

— il-volumi tal-lissija;

— id-distanzi tal-lissija u, fejn xieraq, il-fatturi relevanti tal-mobilità;

— il-plott grafiku ta' % misjuba fis-segmenti tal-ħamrija kontra l-fond tas-segment tal-ħamrija;

— diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

LETTERATURA

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) L-Anness I għad-Direttiva tal-Kummissjoni 95/36/KE tal-14 ta' Lulju 1995 li temenda d-Direttiva tal-Kunsill 91/414/KEE li tirrigwarda t-tqegħid fis-suq tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, ĠU L 172, 22.7.1995, p. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/-Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(13) Il-kapitli li ġejjin ta' dan l-Anness:

Il-Kapitolu A.4, pressjoni tal-fwar

Il-Kapitolu A.6, Solubilità fl-ilma

▼**M6**

Il-Kapitolu A.8, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu tal-flask mheżżeż

Il-Kapitolu A.24, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu HPLC

Il-Kapitolu C.7, degradazzjoni — degradazzjoni abijotika: idroliżi bħala funzjoni tal-pH

Il-Kapitolu C.18, Assorbiment/disorbiment bl-użu ta' metodu ta' ekwilibriju tal-lott

Il-Kapitolu C.23, Trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-ħamrija

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet u unitajiet

Residwu tal-ħamrija li jitħalla jiqdiem: Is-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni preżenti fil-ħamrija wara l-applikazzjoni u wara perjodu twil biżżejjed biex il-proċessi ta' trasport, assorbiment, metaboliżmu, u dissipazzjoni jibdlu d-distribuzzjoni u l-għamla kimika ta' wħud mis-sustanzi kimiċi applikati (1).

Xita artifiċjali: soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$ f'ilma distillat jew dejonizzat.

Distanza Medja ta' Lissija: Il-qiegħ tat-taqsima tal-ħamrija fejn is-sustanza kimika rkuprata kumulattiva = 50 % tas-sustanza kimika tat-test totali rkuprata [esperiment normali tal-lissija], jew; (il-qiegħ tat-taqsima tal-ħamrija fejn is-sustanza kimika rkuprata kumulattiva = 50 % tas-sustanza kimika tat-test totali rkuprata) — ((il-ħxuna tas-saff tar-residwu li tħalla jiqdiem)/2) [l-istudju dwar il-lissija tar-residwu li tħalla jiqdiem]

Sustanza kimika: sustanza jew taħlita.

Lissija: Il-faża milwiema perkolata minn profil tal-ħamrija jew kolonna tal-ħamrija (1).

Lissija: Proċess li bih sustanza kimika tinżel 'l isfel minn ġol-profil tal-ħamrija jew kolonna tal-ħamrija (1).

Distanza ta' lissija: L-iktar segment fond tal-ħamrija li fih instab ≥ 0,5 % tas-sustanza kimika tat-test applikata jew ir-residwu li tħalla jiqdiem wara l-proċess ta' lissija (ekwivalenti għall-fond tal-penetrazzjoni).

Limitu ta' detezzjoni (LOD) u **limitu tal-kwantifikazzjoni (LOQ)**: Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li f'livell inqas minnha l-identità tas-sustanza kimika ma tkunx tista' tiġi differenzjata minn artefatti analitiċi. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li f'livell inqas minnha l-konċentrazzjoni ma tkunx tista' tiġi stabbilita bi preċiżjoni aċċettabbli.

Fattur ta' Mobilità Relattiva tal-RMF: (distanza ta' lissija tas-sustanza kimika tat-test (cm)) / (distanza ta' lissija tas-sustanza kimika ta' referenza (cm))

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Prodott ta' trasformazzjoni: Is-sustanzi kimiċi kollha li jirriżultaw minn reazzjonijiet ta' trasformazzjoni bijotiċi jew abijotiċi tas-sustanza kimika tat-test inklużi CO_2 u prodotti li huma maqbudin f'residwi.

Ħamrija: Taħlita ta' kostitwenti minerali u organiċi tas-sustanzi kimiċi, b'dawn tal-aħħar li fihom komposti ta' kontenut għoli ta' karbonju u nitroġenu u piżijiet molekolari kbar, popolati b'organiżmi żgħar (ħafna minnhom mikroorganiżmi). Il-ħamrija tista' titqandel f'żewġ stati:

— mhux disturbata, kif żviluppat maż-żmien, f'saffi karatteristiċi ta' firxa ta' tipi ta' ħamrija;

— disturbata, kif normalment tinstab fir-raba' jew kif isseħħ meta jittieħdu kampjuni bit-tħaffir u jintużaw f'dan il-metodu ta' ttestjar (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

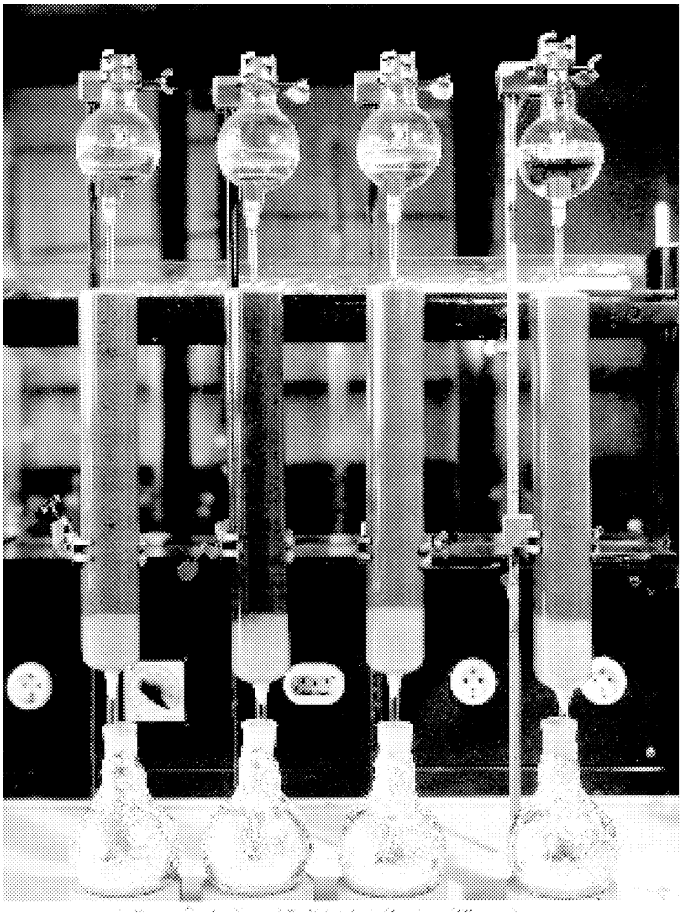
▼M6

Appendiċi 2

Figura 1

Eżempju ta' kolonni ta' lissija li ma jistgħux jinqatgħu magħmulin mill-ħġieġ

B'tul ta' 35 cm u dijametru intern ta' 5 cm (1)



← Imbiebet bi fluss kontrollat għall-applikazzjoni ta' xita artifiċjali

← Disk tas-sinter tal-ħġieġ biex jiġi evitat mili jiġi disturbat il-wiċċ tal-ħamrija u sabiex ix-xita artifiċjali titqassam indaqs

← Kolonna tal-ħġieġ mimlija ħamrija tat-test (meta jiġu ttestjati prodotti fotolabbli, il-kolonni għandhom jitgeżwru f'fojl tal-aluminju)

← Saff ramel kwarzuż

← Tapp tas-suf tal-ħġieġ biex il-ħamrija tinżamm fil-kolonna

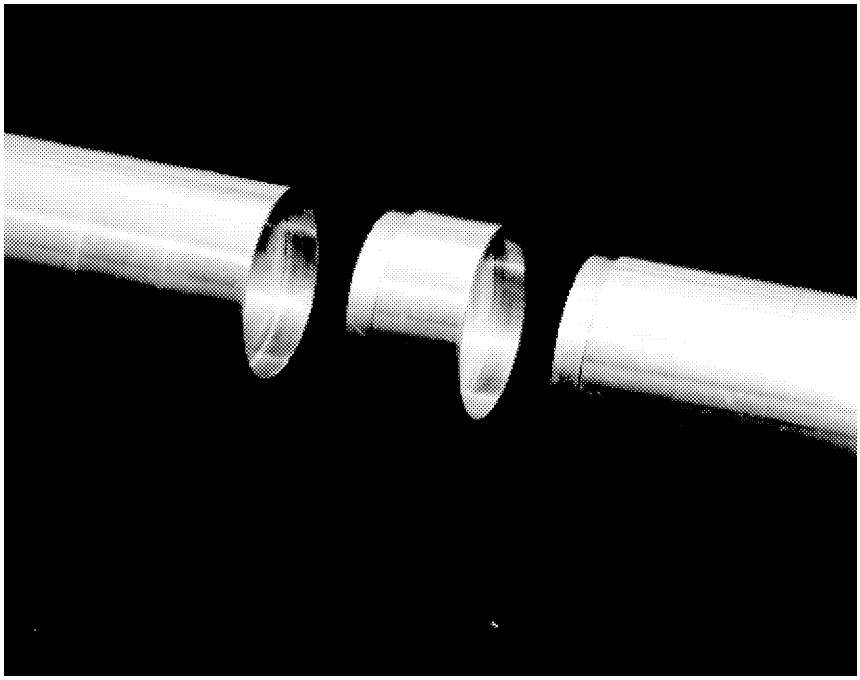
← Flask b'qiegħ tond għall-ġbir tal-lissija; imgeżwer f'fojl tal-aluminju biex tiġi eskluża fotoliżi

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Figura 2

Eżempju ta' kolonna tal-metall li tista' tinqata' b'dijametru intern ta' 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼**M6**

Appendiċi 3

Eżempji ta' Fatturi ta' Mobilità Relattiva (*) (RMF) għal firxa ta' Sustanzi kimiċi għall-protezzjoni tal-uċuħ tar-raba' (1)(2) u l-klassijiet ta' mobilità korrispondenti (+)

Medda tal-RMF	Sustanza Kimika (RMF)	Klassi tal-Mobilità
≤ 0,15	Paratjon (< 0,15), Flurodifen (0,15)	Iimmobbli
0,15 — 0,8	Profenofos (0,18), Propikonażol (0,23), Djażinon (0,28), Djuron (0,38), Terbutilażina (0,52), Metidatjon (0,56), Prometrin (0,59), Propażina (0,64), Alaklor (0,66), Metolaklor (0,68)	II ftit mobbli
0,8 — 1,3	Monuron (**) (1,00), Atrażina (1,03), Simażina (1,04), Fluwometuron (1,18)	III moderatament mobbli
1,3 — 2,5	Prometon (1,67), Ċianażina (1,85), Bromaċil (1,91), Karbutilate (1,98)	IV kemxejn mobbli
2,5 — 5,0	Karbofuran (3,00), Diossakarb (4,33)	V mobbli
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), Dikrotofos (> 5,0)	VI mobbli ħafna

(*) Il-Fattur tal-Mobilità Relattiva huwa derivat kif ġej (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{id} - \text{distanza ta' lissija tas} - \text{sustanza kimika tat} - \text{test(cm)}}{\text{id} - \text{distanza ta' lissija tas} - \text{sustanza kimika ta' referenza(cm)}}$$

(**) Sustanza kimika ta' referenza

\+ Sistemi oħrajn biex tiġi kklassifikata l-mobilità ta' sustanza kimika fil-ħamrija huma bbażati fuq il-valuri tal-R_f mill-kromatografija tas-saff irqiq tal-ħamrija \big(4) u fuq valuri tal-K_{oc} (5)(6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium "Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment." Canterbury, UK, 1-3 July 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

C.45. STIMA TAL-EMISSJONIJIET MILL-INJAM ITTRATTAT BIL-PRESERVATTIV FL-AMBJENT: IL-METODU TAL-LABORATORJU GĦALL-KOMODITAJIET TAL-INJAM LI MHUMIEX KOPERTI U LI HUMA F'KUNTATT MA' ILMA HELU JEW ILMA BAĦAR

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 313 tal-OECD (2007). L-emissjonijiet mill-injam ittrattat bil-preservattiv fl-ambjent iridu jiġu kkwantifikati sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni tar-riskju ambjentali tal-injam ittrattat. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi metodu tal-laboratorju għall-istima tal-emissjonijiet minn injam ittrattat bil-preservattiv f'żewġ sitwazzjonijiet li fihom l-emissjonijiet jistgħu jidħlu fl-ilma:

— Emissjonijiet minn injam ittrattat f'kuntatt ma' ilma ħelu. Emissjonijiet mill-wiċċ tal-injam ittrattat jistgħu jidħlu fl-ilma.

— Emissjonijiet minn injam ittrattat f'kuntatt ma' ilma baħar. Emissjonijiet mill-wiċċ tal-injam ittrattat jistgħu jidħlu fl-ilma baħar.

2. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa maħsub sabiex jiġu ttestjati l-emissjonijiet mill-injam u komoditajiet tal-injam li mhumiex koperti u li huma f'kuntatt ma' ilma ħelu jew ilma baħar. Il-Klassijiet tal-Użu jintużaw b'mod internazzjonali u jikkategorizzaw il-periklu bijoloġiku li għalih ser tkun soġġetta l-komodità ttrattata. Il-Klassijiet tal-Użu jiddefinixxu wkoll is-sitwazzjoni li fiha tintuża l-komodità ttrattata u jistabbilixxu l-kompartimenti ambjentali (arja, ilma, ħamrija) li huma f'riskju potenzjali mill-injam ittrattat bil-preservattiv.

3. Il-metodu ta' ttestjar huwa proċedura tal-laboratorju għall-kisba ta' kampjuni (emissat) minn ilma li fih jitgħaddas l-injam ittrattat, f'intervalli ta' żmien dejjem itwal wara l-espożizzjoni. Il-kwantità ta' emissjonijiet fl-emissat hija marbuta mal-erja tas-superfiċje tal-injam u t-tul tal-espożizzjoni, sabiex jiġi stmat fluss f'mg/m^2/jum. B'hekk ikun jista' jiġi stmat il-fluss (rata ta' lissija) wara perjodi dejjem itwal ta' espożizzjoni.

4. Il-kwantità ta' emissjonijiet tisat' tintuża f'valutazzjoni tar-riskju ambjentali tal-injam ittrattat.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

5. Il-mekkaniżmu ta' lissija fuq wiċċ l-injam mill-ilma frisk mhuwiex supponut li huwa l-istess fl-għamla u s-severità tiegħu bħal-lissija minn wiċċ tal-injam mill-ilma baħar. B'hekk, għal prodotti jew taħlitiet ta' preservattivi tal-injam użati sabiex jittrattaw injam użat f'akwati tal-ilma baħar, hemm bżonn li jsir studju dwar il-lissija tal-injam għall-ilma baħar.

6. L-injam, fil-każ ta' injam ittrattat b'preservattiv tal-injam, għandu jkun jirrappreżenta l-injam użat b'mod kummerċjali. Għandu jiġi ttrattat skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur tal-preservattiv u b'konformità mal-istandards u l-ispeċifikazzjonijiet xierqa. Qabel ma jibda t-test għandhom jiġu ddikjarati l-parametri għall-kundizzjonament wara t-trattament tal-injam.

7. Il-kampjuni tal-injam użati għandhom ikunu jirrappreżentaw il-komoditajiet użati (eż., fir-rigward tal-ispeċijiet, id-densità u karatteristiċi oħrajn).

▼M6

8. It-test jista' jiġi applikat għal injam bl-użu ta' proċess penetrattiv jew applikazzjoni superfiċjali jew għal injam ittrattat li għandu trattament tal-wiċċ obbligatorju addizzjonali (eż. żebgħa li hija applikata bħala rekwiżit għal użu kummerċjali).

9. Il-kompożizzjoni, l-ammont, il-pH u l-għamla fiżika tal-ilma huma importanti sabiex jiġu stabbiliti l-kwantità, il-kontenut u l-għamla tal-emissjonijiet mill-injam.

PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

10. Il-kampjuni tat-test tal-injam ittrattat bil-preservattiv jitgħaddsu fl-ilma. L-ilma (emissat) jinġabar u jiġi analizzat kimikament bosta drabi tul il-perjodu ta' espożizzjoni li jkun twil biżżejjed biex ikunu jistgħu jsiru kalkoli statistiċi. Ir-rati ta' emissjoni f'mg/m^2/jum huma kkalkolati mir-riżultati analitiċi. Il-perjodi ta' kampjunar għandhom jiġu rreġistrati. It-testijiet b'kampjuni mhux ittrattati għandhom jitwaqqfu jekk ma jkun hemm ebda sfond misjub fl-ewwel tliet punti ta' dejta.

11. L-inklużjoni ta' kampjuni tal-injam mhux ittrattat tippermetti li jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond għal emissati minn injam li mhumiex il-preservattiv użat.

KRITERJI TAL-KWALITÀ

Preċiżjoni

12. Il-preċiżjoni tal-metodu ta' ttestjar biex tiġi stmata l-emissjoni tiddependi minn kemm il-kampjuni tat-test jirrappreżentaw l-injam ittrattat kummerċjalment, kemm l-ilma jirrappreżenta ilma veru u kemm ir-reġim ta' espożizzjoni jirrappreżenta l-kundizzjonijiet naturali.

13. Il-preċiżjoni, ir-reqqa u r-ripetibilità tal-metodu analitiku għandhom jiġu stabbiliti qabel ma jsir it-test.

Riproduċibilità

14. Jinġabru u jiġu analizzati tliet kampjuni ta' ilma u l-valur medju jittieħed bħala l-valur ta' emissjoni. Ir-riproduċibilità tar-riżultati fi ħdan laboratorju wieħed u bejn laboratorji differenti tiddependi mir-reġim ta' tgħaddis u l-injam użat bħala kampjuni tat-test.

Medda Aċċettabbli tar-Riżultati

15. Medda tar-riżultati minn dan it-test li fiha l-valuri superjuri u inferjuri jvarjaw b'inqas minn ordni ta' manjitudni waħda hija aċċettabbli.

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST

Ilma

16. Xenarji ta' lissija ta' ilma ħelu: Ilma dejonizzat (eż., ASTM D 1193 Tip II) huwa rrakkomandat sabiex jintuża fit-test tal-lissija meta jkun irid jiġi evalwat injam espost għal ilma ħelu. It-temperatura tal-ilma għandha tkun 20 °C +/– 2 °C u l-pH imkejla u t-temperatura tal-ilma jridu jkunu inklużi fir-rapport tat-test. Analiżi tal-kampjuni tal-ilma użat meħudin qabel it-tgħaddis tal-kampjuni ttrattati tippermetti li jiġu stmati s-sustanzi kimiċi analizzati fl-ilma. Dan huwa kontroll sabiex jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond tas-sustanzi kimiċi li mbagħad jiġu analizzati kimikament.

▼M6

17. Xenarji ta' lissija tal-ilma baħar: Ilma baħar sintetiku (eż., ASTM D 1141 Ilma tal-Oċean Sostitut mingħajr Metalli Tqal) huwa rrakkomandat sabiex jintuża fit-test tal-lissija meta jkun irid jiġi evalwat injam espost għal ilma baħar. It-temperatura tal-ilma għandha tkun 20 °C +/– 2 °C u l-pH imkejla u t-temperatura tal-ilma jridu jkunu inklużi fir-rapport tat-test. Analiżi tal-kampjuni tal-ilma użat meħudin qabel it-tgħaddis tal-kampjuni ttrattati tippermetti li jiġu stmati s-sustanzi kimiċi analizzati fl-ilma. Dan huwa kontrol għall-analiżi tal-livelli ta' sfond għas-sustanzi kimiċi ta' importanza.

Kampjuni tat-Test tal-Injam

18. L-ispeċijiet tal-injam għandhom ikunu dawk tipiċi tal-ispeċijiet tal-injam użati għall-ittestjar tal-effikaċja tal-preservattivi tal-injam. L-ispeċijiet rakkomandati huma *Pinus sylvestris L.* (arżnu tal-Iskozja), *Pinus resinosa Ait.* (arżnu aħmar) jew *Pinus spp* (arżnu tan-Nofsinhar). Jistgħu jsiru testijiet addizzjonali bl-użu ta' speċijiet oħrajn.

19. Għandu jintuża injam b'vina dritta mingħajr ingroppi. Għandu jiġi evitat materjal b'dehra reżinuża. L-injam għandu jkun injam tipiku disponibbli kummerċjalment. Għandhom jiġu rreġistrati s-sors, id-densità u n-numru ta' ċrieki annwali għal kull 10 mm.

20. Huwa rrakkomandat li l-kampjuni tat-test tal-injam ikunu settijiet ta' ħamsa skont l-EN 113 blokok tad-daqs (dimensjonijiet ta' 25 mm × 50 mm × 15 mm) bin-naħat longitudinali paralleli għall-vina tal-injam, għad li jistgħu jintużaw dimensjonijiet oħrajn bħal 50 mm, b'150 mm, b'10 mm. Il-kampjun tat-test għandu jitgħaddas kompletament fl-ilma. Il-kampjuni tat-test għandhom ikunu 100 % lbieba taz-zokk tas-siġra. Kull kampjun jiġi mmarkat b'mod uniku sabiex ikun jista' jiġi identifikat matul it-test kollu.

21. Il-kampjuni kollha tat-test għandhom jiġu nċanati jew illixxati bis-serrieq u l-uċuħ ma għandhomx jiġu mrammlin.

22. In-numru ta' settijiet ta' kampjuni tat-test tal-injam użati għall-analiżi huwa tal-inqas ħamsa: tliet settijiet ta' kampjuni jiġu ttrattati bil-preservattiv, sett ta' kampjuni ma jiġix ittrattat u sett ta' kampjuni sabiex jiġi stmat il-kontenut ta' umdità mnixxef bil-forn tal-kampjuni tat-test qabel it-trattament. Jitħejjew biżżejjed kampjuni tat-test sabiex ikunu jistgħu jingħażlu tliet settijiet ta' kampjuni li huma fi ħdan 5 % tal-valur medju tar-retenzjonijiet tal-preservattivi tal-grupp ta' kampjuni tat-test.

23. Il-kampjuni kollha tat-test huma ssiġillati fit-truf b'sustanza kimika li tevita milli l-preservattiv jippenetra fil-vina tat-tarf tal-kampjuni jew tevita lissija mill-kampjuni mill-vina tat-tarf. Hemm bżonn li ssir distinzjoni bejn kampjuni użati għall-applikazzjoni superfiċjali u l-proċessi ta' penetrazzjoni għall-applikazzjoni tas-siġillant tat-truf. L-applikazzjoni tas-siġillant tat-truf trid issir qabel it-trattament fil-każ ta' applikazzjoni superfiċjali biss.

24. Il-vina tat-truf trid tinfetaħ għat-trattamenti permezz ta' proċessi ta' penetrazzjoni. Għalhekk, il-kampjuni jridu jiġu ssiġillati fit-truf fi tmiem il-perjodu ta' kundizzjonament. L-emissjoni trid tiġi stmata għan-naħa tal-wiċċ longitudinali biss. Is-siġillanti għandhom jiġu spezzjonati u jerġgħu jiġu applikati jekk ikun hemm bżonn qabel ma tibda l-lissija u ma għandhomx jerġgħu jiġu applikati wara li tkun bdiet il-lissija.

▼M6

Kontenitur tat-Tgħaddis

25. Il-kontenitur huwa magħmul minn materjal inerti u huwa kbir biżżejjed biex ikun jiflaħ għal 5 kampjuni tal-injam EN113 f'500 ml ilma li jirriżultaw fi proporzjon ta' erja tas-superfiċje għal volum tal-ilma ta' 0,4 cm^2/ml.

Assemblaġġ tat-Test tal-Kampjuni

26. Il-kampjuni tat-test huma sostnuti fuq assemblaġġ li jippermetti sabiex l-uċuħ esposti kollha tal-kampjun jidħlu f'kuntatt mal-ilma.

PROĊEDURA GĦAT-TRATTAMENT TA' PRESERVAZZJONI

Tħejjija tal-Kampjuni tat-Test Ittrattati

27. Il-kampjun tat-test tal-injam li ser jiġi ttrattat bil-preservattiv fit-test jiġi ttrattat bil-metodu speċifikat għall-preservattiv, li jista' jkun permezz ta' proċess ta' trattament b'penetrazzjoni jew proċessi ta' applikazzjoni superfiċjali, li jista' jkun b'għodsa, sprejjar jew pinzellata.

Preservattivi li jiġu applikati bi proċess ta' trattament b'penetrazzjoni

28. Għandha titħejja soluzzjoni tal-preservattiv li tikseb it-teħid jew iż-żamma speċifikati meta jiġu applikati bl-użu tal-proċess ta' trattament b'penetrazzjoni. Il-kampjun tat-test tal-injam jintiżen u jitkejlu d-daqsijiet tiegħu. Il-proċess ta' trattament b'penetrazzjoni għandu jiġi speċifikat għall-applikazzjoni tal-preservattiv għall-injam sabiex jintuża fil-Klassi tal-Użu 4 jew 5. Il-kampjun jerġa' jintiżen wara t-trattament u r-retenzjoni tal-preservattiv (kg/m^3) tiġi kkalkolata bl-ekwazzjoni:

$$\frac{\text{Massa wara t} - \text{trattament(kg)} - \text{Massa qabel it} - \text{trattament(kg)}}{\text{Volum tal} - \text{kampjun tat} - \text{test}(m^3)} \times \frac{\text{Soluzzjoni Konċentrazzjoni(\% massa/massa)}}{100}$$

29. Kun af li f'dan it-test jista' jintuża injam ittrattat f'impjant tat-trattament industrijali \big(eż. b'mili bi pressjoni ta' vakwu). Il-proċeduri użati għandhom jiġu rreġistrati u r-retenzjoni tal-materjal ittrattat b'dan il-mod għandha tiġi analizzata u rreġistrata.

Preservattivi li jiġu applikati bi proċessi ta' applikazzjoni superfiċjali

30. Il-proċess ta' applikazzjoni superfiċjali jinkludi għodsa, sprejjar jew pinzellata tal-kampjuni tat-test tal-injam. Il-proċess u r-rata ta' applikazzjoni (eż. litri/m^2) għandhom ikunu kif speċifikat għall-appikazzjoni superfiċjali tal-preservattiv.

31. Kun af ukoll li f'dan il-każ jista' jintuża injam ittrattat f'impjant tat-trattament industrijali. Il-proċeduri użati għandhom jiġu rreġistrati u r-retenzjoni tal-materjal ittrattat b'dan il-mod trid tiġi analizzata u rreġistrata.

Kondizzjonament tal-Kampjuni tat-Test wara t-Trattament

32. Wara t-trattament, il-kampjuni tat-test ittrattati għandhom jiġu kondizzjonati skont ir-rakkomandazzjonijiet magħmulin mill-fornitur tal-preservattiv tat-test skont ir-rekwiżiti tat-tikketta tal-preservattiv jew b'konformità mal-prattiki tat-trattament kummerċjali jew skont l-Istandard EN 252.

▼M6

Tħejjija u Għażla tal-Kampjuni tat-Test

33. Wara l-kondizzjonament ta' wara t-trattament, ir-retenzjoni medja tal-grupp tal-kampjuni tat-test tiġi kkalkolata u jingħażlu għal għarrieda tliet settijiet rappreżentattivi tal-kampjuni b'retenzjoni li tkun fi ħdan 5 % mill-medja għall-grupp sabiex titkejjel il-lissija.

PROĊEDURA GĦALL-KEJLIET TAL-EMISSJONI TAL-PRESERVATTIVI

Metodu ta' Immersjoni

34. Il-kampjuni tat-test jintiżnu u wara jitgħaddsu kompletament fl-ilma u jiġu rreġistrati d-data u l-ħin. Il-kontenitur jitgħatta biex tonqos l-evaporazzjoni.

35. L-ilma jinbidel kull ċertu żmien li ġej: 6 sigħat, jum, jumejn, 4 ijiem, 8 ijiem, 15-il jum, 22 jum, 29 jum (nota: dawn huma l-ħinijiet/żminijiet totali mhux il-ħinijiet/żminijiet ta' intervall). Għandhom jiġu rreġistrati ż-żmien u d-data tal-bidla tal-ilma u l-massa tal-ilma rkuprata mill-kontenitur.

36. Wara kull bidla tal-ilma, jinżamm kampjun tal-ilma li fih tgħaddas is-sett ta' kampjuni tat-test sabiex imbagħad tkun tista' ssir analiżi kimika.

37. Il-proċedura ta' kampjunar tippermetti li jiġi kkalkolat il-profil tal-kwantità tal-emissjonijiet kontra ż-żmien. Il-kampjuni għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet li jippreservaw l-analit, eż., fi friġġ fid-dlam biex jonqos it-tkabbir ta' mikrobi fil-kampjun qabel l-analiżi.

KEJLIET TAL-EMISSJONIJIET

Kampjuni Ttrattati

38. L-ilma miġbur jiġu analizzat kimikament għas-sustanza attiva u/jew il-prodotti relevanti ta' degradazzjoni/trasformazzjoni, jekk ikun xieraq.

Kampjuni Mhux Ittrattati

39. Il-ġbir tal-ilma (emissat) f'din is-sistema u l-analiżi sussegwenti tas-sustanzi kimiċi li ġew lixxivjati mill-kampjuni ta' injam mhux ittrattati jippermetti sabiex tiġi stmata r-rata possibbli ta' emissjoni tal-preservattiv mill-injam mhux ittrattat. Il-ġbir u l-analiżi tal-emissat wara perjodi ta' żmien dejjem itwal jippermettu sabiex tiġi stmata r-rata ta' bidla tar-rata ta' emissjoni maż-żmien. Din l-analiżi hija proċedura tal-kontroll sabiex jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond tas-sustanza kimika tat-test f'injam mhux ittrattat sabiex jiġi kkonfermat li l-injam użat bħala sors tal-kampjuni ma jkunx ġie ttrattat minn qabel bil-preservattiv.

DEJTA U RAPPORTAR

Analiżijiet Kimiċi

40. L-ilma miġbur jiġi analizzat kimikament u r-riżultat tal-analiżi tal-ilma tingħata f'unitajiet xierqa, eż., µg/l.

Rapportar tad-Dejta

41. Jiġu rreġistrati r-riżultati kollha. L-Appendiċi juri eżempju ta' formola ta' reġistrazzjoni ssuġġerita għal sett wieħed ta' kampjuni tat-test ittrattati, u t-tabella sommarju sabiex jiġu kkalkolati l-valuri medji ta' emissjoni tul kull intervall tal-kampjunar.

42. Il-fluss ta' emissjoni ta' kuljum f'mg/m^2/jum jiġi kkalkolat bit-teħid tal-medja tat-tliet kejliet mit-tliet irreplikati u d-diviżjoni bin-numru ta' jiem tat-tgħaddis.

▼M6

Rapport tat-Test

43. Tal-inqas għandha tiġi pprovduta l-informazzjoni li ġejja fir-rapport tat-test:

— Isem il-fornitur tal-preservattiv attwalment ittestjat;

— L-isem jew il-kodiċi speċifiku u uniku tal-preservattiv ittestjat;

— L-isem kummerċjali jew komuni tal-ingredjent(i) attiv(i) b'deskrizzjoni ġenerika tal-koformulanti (eż. kosolvent, reżina), u l-kompożizzjoni f' % m/m tal-ingredjenti;

— Ir-retenzjoni jew it-tagħbija relevanti (f'kg/m^3 jew l/m^2, rispettivament) speċifikati għall-injam użat f'kuntatt mal-ilma;

— L-ispeċi ta' injam użata, bid-densità tagħha u r-rata ta' tkabbir fi ċrieki kull 10 mm;

— It-tagħbija jew ir-retenzjoni tal-preservattiv ittestjat u l-formula użata sabiex tiġi kkalkolata r-retenzjoni, mogħtija bħala l/m^2 jew kg/m^3;

— Il-metodu ta' applikazzjoni tal-preservattiv, li jispeċifika l-iskeda tat-trattament użata għal proċess ta' penetrazzjoni, u l-metodu ta' applikazzjoni jekk intuża trattament superfiċjali;

— Id-data ta' applikazzjoni tal-preservattiv, u stima tal-kontenut ta' umdità tal-kampjuni tat-test, mogħtijin bħala perċentwal;

— Il-proċeduri ta' kondizzjonament użati, billi jiġu speċifikati t-tip, il-kundizzjonijiet u d-durata;

— Speċifikazzjoni tas-siġillant tat-truf użat u kemm-il darba ġie applikat;

— Speċifikazzjoni ta' kwalunkwe trattament sussegwenti tal-injam, eż. speċifikazzjoni tal-fornitur, it-tip, il-karatteristiċi u t-tagħbija ta' żebgħa;

— Il-ħin u d-data ta' kull avveniment ta' tgħaddis, l-ammont ta' ilma użat għat-tgħaddis tal-kampjuni tat-test f'kull avveniment, u l-ammont ta' ilma assorbit mill-injam matul l-għodsa;

— Kwalunkwe varjazzjoni mill-metodu deskritt u kwalunkwe fattur li seta' influwenza r-riżultati.

LETTERATURA

(1) European Standard, EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

(2) European Standard, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

(3) European Standard, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) European Standard, EN 335 — Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part1: General.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

Appendiċi 1

Formola ta' reġistrazzjoni għall-metodu ta' ttestjar

Stima ta' Emissjonijiet mill-Injam Ittrattat bil-Preservattiv fl-Ambjent: Metodu tal-Laboratorju għall-Komoditajiet tal-Injam li mhumiex Koperti u li huma f'Kuntatt ma' Ilma Ħelu jew Ilma Baħar

Laboratorju tat-test	

Preservattiv tal-injam

Il-fornitur tal-preservattiv	
L-isem jew il-kodiċi speċifiku u uniku tal-preserattiv	
L-isem kummerċjali jew komuni tal-preservattiv	
Il-koformulanti	
Ir-retenzjoni relevanti għall-injam użat f'kuntatt mal-ilma	

Applikazzjoni

Il-metodu ta' applikazzjoni	
Id-data ta' applikazzjoni	
Il-formula użata biex tiġi kkalkolata r-retenzjoni:	
Il-proċedura ta' kondizzjonament	
Id-durata tal-kondizzjonament	
Is-siġillant tat-truf / kemm-il darba ġie applikat	
It-trattament sussegwenti	jekk relevanti

Kampjuni tat-test

Speċijiet ta' injam	
Densità tal-injam	(minimu … valur medju … massimu)
Rata ta' tkabbir (ċrieki għal kull 10 mm)	(minimu … valur medju … massimu)
Kontenut ta' umdità	

▼**M6**

Assemblaġġi tat-test (*)	**Retenzjoni (eż. kg/m^3)**
Ittrattat “x”	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Ittrattat “y”	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Ittrattat “z”	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Mhux ittrattat	
Varjazzjoni tal-parametri tal-metodu ta' ttestjar	eż. kwalità tal-ilma, dimensjoni tal-kampjuni tat-test eċċ.

(*) x, y, z jirrappreżentaw it-tliet kampjuni tal-irreplikat

▼M6

Żmien	Bidla tal-ima	Massa tal-kampjun		Teħid ta' ilma		Kampjun ta' ilma				
		Ittrattat (medju)	Mhux ittrattat	Ittrattat (medju)	Mhux ittrattat		Ilma tat-test	x	y	z
	Data	g	g	g	g	nru	pH	pH	pH	pH
bidu										
6 sigħat						1				
24 siegħa						2				
jumejn						3				
4 j						4				
8 j						5				
15-il j						6				
22 j						7				
29 j						8				

▼M6

Jekk jogħġbok ħejji tabelli separati għal kull ingredjent attiv

Żmien	Bidla tal-Ilma	Riżultati Analitiċi															
		Kampjuni Mhux Ittrattati			Kampjuni Ttrattati												
		Konċentrazzjoni a.i fl-ilma mg/l	Kwantità emessa mg/m^2	Rata ta' emissjoni mg/m^2/jum	Konċentrazzjoni a.i. fl-ilma				Kwantità emessa				Rata ta' emissjoni			
					x	y	z	Medja	x	y	z	Medja	x	y	z	Medja
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2/d	mg/m^2/d	mg/m^2/d	mg/m^2/d
6 sigħat																
24 siegħa																
jumejn																
4 j																
8 j																
15-il j																
22 j																
29 j																

Nota: Peress li r-riżultati mill-kampjuni mhux ittrattati jaf ikollhom jintużaw sabiex jiġu korretti r-rati ta' emissjoni mill-kampjuni mhux, ir-riżultati tal-mhux ittrattati għandhom jiġu l-ewwel u l-valuri kollha għall-kampjuni ttrattati jkunu "valuri korretti". Jista' jkun hemm ukoll korrezzjoni għall-analiżi tal-ilma inizjali.

▼**M6**

Appendiċi 2

Definizzjonijiet

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata b'dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M6

C.46. **BIJOAKKUMULAZZJONI F'OLIGOĊAETI BENTIĊI LI JGĦIXU FIN-NAQAL**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar (TG) 315 tal-OECD (2008) Annimali endobentiċi li jinġestu n-naqal jistgħu jkunu esposti għal sustanzi maqbudin fin-naqal (1). Fost dawn l-inġesturi tan-naqal, l-oligoċaeti akkwatiċi għandhom rwol importanti fil-qigħan tas-sistemi akkwatiċi. Jgħixu fin-naqal u spiss jirrappreżentaw l-iktar speċijiet abbundanti, speċjalment f'ħabitats b'kundizzjonijiet ambjentali avversi għal annimali oħrajn. Minħabba l-bijoturbazzjoni tan-naqal u peress li jservu ta' priża, dawn l-annimali jista' jkollhom influwenza kbira fuq il-bijodisponibilità tat-tali sustanzi għal organiżi oħrajn, eż. ħut bentivoruż. Għall-kuntrarju ta' organiżmi epibentiċi, l-oligoċaeti akkwatiċi endobentiċi jħaffru fin-naqal, u jinġestu partikoli tan-naqal taħt il-wiċċ tan-naqal. Għalhekk, dawn l-organiżmi huma esposti għal sustanzi permezz ta' ħafna rotot ta' teħid, inklużi kuntatt dirett, l-inġestjoni ta' partikoli kontaminati tan-naqal, ilma tal-pori u ilma tal-madwar. Ċerti speċijiet ta' oligoċaeti bentiċi li bħalissa jintużaw fl-ittestjar ekotossikoloġiku huma deskritti fl-Appendiċi 6.

2. Il-parametri li jikkaratterizzaw il-bijoakkumulazzjoni ta' sustanza jinkludu l-ewwel u qabel kollox il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF), il-kostanti tar-rata ta' teħid tan-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e). Id-definizzjonijiet iddettaljati ta' dawn il-parametri huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

3. Biex tivvaluta l-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi inġenerali, u biex tinvestiga l-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi li għandhom tendenza jinqasmu fin-naqal jew fuqu, huwa meħtieġ metodu ta' ttestjar speċifiku għall-kompartiment (1)(2)(3)(4).

4. Il-metodu ta' ttestjar huwa mfassal sabiex tiġi vvalutata l-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi assoċjati man-naqal f'dud oligoċaet endobentiku. Is-sustanza tat-test hija miżjuda fin-naqal. L-użu ta' naqal miżjud huwa maħsub sabiex jissimula naqal ikkontaminat.

5. Dan il-metodu huwa bbażat fuq il-metodi eżistenti ta' ttestjar tat-tossiċità u l-bijoakkumulazzjoni tan-naqal (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Dokumenti siewja oħrajn huma: id-diskussjonijiet u r-riżultati ta' sessjoni ta' ħidma internazzjonali (11), u l-eżitu ta' ringtest internazzjonali (12).

6. Dan it-test japplika għal sustanzi organiċi stabbli u newtrali, li għandhom tendenza li jaqbdu man-naqal. Il-bijoakkumulazzjoni ta' komposti metalorganiċi stabbli li jaqbdu man-naqal tista' titkejjel b'dan il-metodu wkoll (12). Mhuwiex applikabbli għal metalli u elementi traċċa oħrajn (11) bla modifika tad-disinn tat-test fir-rigward tas-substrat u l-volumi ta' ilma, u possibilment id-daqs tal-kampjun tat-tessut.

PREREKWIŻIT U INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

7. Bħalissa hemm disponibbli biss ftit Relazzjonijiet Kwantitattivi stabbiliti sew bejn l-Istruttura u l-Attività (QSAR) rigward il-proċessi ta' bijoakkumulazzjoni (14). L-iktar relazzjoni użata b'mod komuni hija l-korrelazzjoni bejn il-bijoakkumulazzjoni u l-bijokonċentrazzjoni ta' sustanzi organiċi stabbli u l-lipofiliċità tagħhom (mogħtija bħala l-logaritma tal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (log K_{ow}); ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni), rispettivament, li ġiet żviluppata għad-deskrizzjoni ta' sustanza b'partizzjoni bejn l-ilma u l-ħut. Korrelazzjonijiet għall-kompartiment tan-naqal ġew stabbiliti bl-użu ta'

▼M6

din ir-relazzjoni wkoll (15)(16)(17)(18). Il-korrelazzjoni log K_{ow}-log tal-BCF bħala QSAR prinċipali tista' tkun siewja għall-ewwel stima preliminari tal-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi li jaqbdu man-naqal. Madankollu, il-BAF jista' jkun influwenzat minn kontenut lipidu tal-organiżmu tat-test u l-kontenut ta' karbonju organiku tan-naqal. Għalhekk, il-koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju/ilma (K_{oc}) jista' jintuża wkoll bħala determinant importanti tal-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi organiċi assoċjati man-naqal.

8. Dan it-test huwa applikabbli għal:

— sustanzi stabbli u organiċi b'valuri tal-log K_{ow} ta' bejn 3,0 u 6,0 (5)(19) u sustanzi superlipofiliċi li juru log K_{ow} ta' iktar minn 6,0 (5);

— sustanzi li jappartjenu għal klassi ta' sustanzi organiċi magħrufin għall-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tagħhom f'organiżmi ħajjin, eż. tensjoattivi jew sustanzi ferm assorbenti (eż. K_{oc} għoli).

9. L-informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, bħal prekawzjonijiet tas-sikurezza, kundizzjonijiet u stabbiltà xierqa tal-ħżin, u metodi analitiċi għandha tinkiseb qabel jinbeda l-istudju. Gwida għall-ittestjar ta' sustanzi bi karatteristiċi fiżikokimiċi li jagħmluha diffiċili sabiex jiġu ttestjati hija pprovduta f'(20) u (21). Qabel ma jsir test għall-bijoakkumulazzjoni b'oligoċaeti, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test:

— l-isem komuni, isem is-sustanza kimika (idealment l-isem tal-IUPAC), il-formula strutturali, in-numru tar-reġistru tas-CAS, il-purità;

— is-solubilità fl-ilma [metodu ta' ttestjar A.6 (22)];

— il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma, K_{ow} [il-metodi ta' ttestjar A.8, A.24 (22)];

— il-koeffiċjent ta' partizzjoni ilma/naqal, mogħti bħala K_d jew K_{oc} [metodu ta' ttestjar C,19 (22)];

— idroliżi [metodu ta' ttestjar C.7 (22)];

— fototrasformazzjoni fl-ilma (23);

— pressjoni tal-fwar [metodu ta' ttestjar A.4 (22)];

— bijodegradabilità lesta [metodi ta' ttestjar C.4 u C.29 (22)];

— tensjoni tas-superfiċje [metodu ta' ttestjar A.5 (22)];

— konċentrazzjoni kritika ta' miċelli (24).

Barra minn hekk, l-informazzjoni li ġejja — meta tkun disponibbli- tkun relevanti:

— il-bijodegradazzjoni fl-ambjent akkwatiku [metodi ta' ttestjar C.24 u C.25 (22)];

— il-kostanti tal-liġi ta' Henry.

10. Sustanzi tat-test radjuttikkettati jistgħu jħaffu l-analiżi tal-kampjuni ta' ilma, naqal u bijoloġiċi, u jistgħu jintużaw sabiex jiġi stabbilit jekk għandhomx jiġu identifikati u kkwantifikati l-prodotti ta' degradazzjoni. Il-metodu deskritt hawnhekk ġie vvalidat f'ringtest internazzjonali (12) għal sustanzi ttikkettati ^{14}C. Jekk jitkejlu r-residwi radjuattivi totali, il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF) ikun ibbażat fuq is-sustanza prinċipali inkluż kwalunkwe prodott ta' degradazzjoni miżmum. Huwa possibbli wkoll li studju dwar il-metaboliżmu jitgħaqqad flimkien ma' studju dwar il-bijoakkumulazzjoni b'analiżi u kwantifikazzjoni tal-perċentwal ta' sustanza prinċipali u l-prodotti

▼M6

ta' degradazzjoni tagħha f'kampjuni meħudin fi tmiem il-fażi ta' teħid jew fl-ogħla livell ta' bijoakkumulazzjoni. Xorta waħda dejjem huwa rrakkomandat li l-kalkolu tal-BAF ikun ibbażat fuq il-konċentrazzjoni tas-sustanza prinċipali fl-organiżmi u mhux biss fuq residwi radjuattivi totali.

11. Minbarra l-karatteristiċi tas-sustanza tat-test, informazzjoni oħra li hija meħtieġa hija t-tossiċità għall-ispeċijiet ologoċaeti li għandhom jintużaw fit-test, bħal konċentrazzjoni letali medjana (LC_{50}) għall-perjodu meħtieġ għall-fażi tat-teħid, sabiex jiġi żgurat li l-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni magħżulin huma ferm inqas mil-livelli tossiċi. Jekk disponibbli, għandha tingħata preferenza lil valuri tat-tossiċità miġjubin minn studji fit-tul fuq punti ta' tmiem subletali (EC_{50}). Jekk it-tali dejta ma tkunx disponibbli, test dwar it-tossiċità akuta fl-istess kundizzjonijiet bħall-kundizzjonijiet tat-test tal-bijoakkumulazzjoni, jew dejta dwar it-tossiċità fuq dejta ta' speċijiet surrogati oħrajn jistgħu jipprovdi informazzjoni siewja.

12. Irid ikun disponibbli metodu analitiku xieraq bi preċiżjoni, reqqa u sensittività magħrufin sabiex jikkwantifika s-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test, fin-naqal u fil-materjal bijoloġiku, flimkien ma' dettalji tat-tħejjija u l-ħżin tal-kampjun kif ukoll l-iskedi ta' dejta ta' sigurtà tal-materjali. Għandhom ikunu magħrufin ukoll il-limiti ta' detezzjoni analitika tas-sustanza tat-test fl-ilma, in-naqal u t-tessut tad-dud. Jekk tintuża sustanza tat-test radjuttikkettata, ir-radjuattività speċifika (jiġifieri Bq mol^{-1}), il-pożizzjoni tal-atomu radjuttikkettat, u l-perċentwal ta' radjuattività assoċjat mal-impuritajiet iridu jkunu magħrufin ukoll. Ir-radjuattività speċifika tas-sustanza tat-test għandha tkun għolja kemm jista' jkun sabiex jinstabu l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test possibbli (11).

13. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar il-karatteristiċi tan-naqal li ser jintuża (eż. l-oriġini tan-naqal jew il-kostitwenti tiegħu, il-pH u l-konċentrazzjoni ta' ammonijaka tal-ilma tal-pori (naqal tal-għelieqi), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal) (6).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. It-test jikkonsisti f'żewġ fażijiet; il-fażi ta' teħid (espożizzjoni) u l-fażi ta' eliminazzjoni (wara l-espożizzjoni). Matul il-fażi tat-teħid, id-dud jiġi espost għan-naqal miżjud bis-sustanza tat-test, flimkien ma' ilma rikostitwit u ekwilibrat kif xieraq (11). Il-gruppi tad-dud tal-kontroll jinżammu fl-istess kundizzjonijiet mingħajr is-sustanza tat-test.

15. Għall-fażi tal-eliminazzjoni, id-dud jiġi ttrasferit f'sistema ta' naqal u ilma ħielsa mis-sustanza tat-test. Fażi ta' eliminazzjoni hija neċessarja biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rata li biha s-sustanza tat-test titneħħa mill-organiżmi tat-test (19)(25). Fażi ta' eliminazzjoni dejjem tkun meħtieġa sakemm it-teħid tas-sustanza tat-test matul il-fażi ta' espożizzjoni ma jkunx insinifikanti (eż. ma jkun hemm ebda differenza statistika bejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud tat-test u tal-kontroll). Jekk ma jkunx inkiseb stat kostanti matul il-fażi tat-teħid, id-determinazzjoni tal-kinetika — il-kostanti tal-BAF_k, it-teħid u r-rata ta' eliminazzjoni — tista' ssir bl-użu tar-riżultati tal-fażi ta' eliminazzjoni. Bidla fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud/fuqhom tiġi ssorveljata matul iż-żewġ fażijiet tat-test.

16. Matul il-fażi tat-teħid, isiru kejliet sakemm il-BAF ikun laħaq plateau jew stat kostanti. Is-soltu, it-tul tal-fażi tat-teħid għandu jkun ta' 28 jum. L-esperjenza fil-prattika wriet li fażi ta' teħid ta' bejn 12 u 14-il jum hija biżżejjed sabiex bosta sustanzi organiċi newtrali stabbli jilħqu stat kostanti (6)(8)(9).

▼M6

17. Madankollu, jekk l-istat kostanti ma jintlaħaqx sal-jum 28, il-fażi ta' eliminazzjoni tinbeda bit-trasferiment tal-oligoċaeti esposti fir-reċipjenti li fihom l-istess midjum mingħajr is-sustanza tat-test. Il-fażi ta' eliminazzjoni tintemm meta jew jintlaħaq il-livell ta' 10 % tal-konċentrazzjoni mkejla fid-dud fil-jum 28 tal-fażi ta' teħid, jew inkella wara tul massimu ta' 10 ijiem. Il-livell residwu fid-dud fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni jiġi rrapportat bħala punt ta' tmiem addizzjonali, eż. bħala Residwi mhux eliminati (NER). Il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF_{ss}) huwa kkalkolat idealment kemm bħala l-proporzjon ta' konċentrazzjoni f'dud (C_a) kif ukoll fin-naqal (C_s) fi stat li jidher kostanti, u bħala fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika, BAF_K bħala l-proporzjon tal-kostanti tar-rata ta' teħid min-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) jekk tiġi supponuta kinetika tal-ewwel ordni. Jekk ma jintlaħaqx stat kostanti fi żmien 28 jum, ikkalkola l-BAF_k mill-kostanti tar-rata ta' teħid u dak tar-rata ta' eliminazzjoni. Għall-kalkolu ara l-Appendiċi 2. Jekk ma tkunx applikabbli kinetika tal-ewwel ordni, għandhom jitħaddmu mudelli iktar kumplessi Appendiċi 2 u referenza (25).

18. Jekk ma jinkisibx stadju kostanti fi żmien 28 jum, il-fażi tat-teħid tista' tiġi estiża billi l-gruppi ta' dud espost — jekk possibbli — jiġu soġġetti għal iktar kejliet sakemm jintlaħaq l-istat kostanti; b'mod parallel, il-fażi ta' tneħħija xorta waħda għandha tinbeda fil-jum 28 tal-fażi ta' teħid.

19. Il-kostanti tar-rata ta' teħid, il-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (jew bosta kostanti, meta jkunu involuti mudelli iktar kumplessi), il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K) u, fejn possibbli, il-limiti ta' kunfidenza ta' kull wieħed minn dawn il-parametri huma kkalkolati minn ekwazzjonijiet b'mudell kompjuterizzat (ara l-Appendiċi 2 għall-mudelli). Kemm kwalunkwe mudell ikun xieraq jista' jiġi stabbilit mill-koeffiċjent ta' korrelazzjoni jew il-koeffiċjent ta' determinazzjoni (koeffiċjenti qrib 1 jindikaw idoneità).

20. Biex tonqos il-varjabbiltà fir-riżultati tat-test għal sustanzi organiċi b'lipofiliċità għolja, il-fatturi tal-bijoakkumulazzjoni għandhom jingħataw ukoll b'rabta mal-kontenut lipidu tal-organiżmi tat-test u l-kontenut ta' karbonju organiku (TOC) fin-naqal (fattur ta' akkumulazzjoni ta' bijota-naqal jew BSAF f'kg TOC tan-naqal kg^{-1} ta' kontenut lipidu tad-dud). Dan l-approċċ huwa bbażat fuq esperjenzi u korrelazzjonijiet teoriċi għall-kompartiment akkwatiku, fejn — għal ċerti klassijiet ta' sustanzi kimiċi — hemm relazzjoni ċara bejn il-potenzjal li sustanza tibbijoakkumula u l-lipofiliċità tagħha, li ġiet stabbilita sew għall-ħut bħala organiżmi mudell (14)(25)(27). Hemm anki relazzjoni bejn il-kontenut lipidu tal-ħut tat-test u l-bijoakkumulazzjoni osservata tat-tali sustanzi. Għal organiżmi bentiċi, instabu korrelazzjonijiet simili (15)(16)(17)(18). Jekk hemm biżżejjed tessut tad-dud disponibbli, il-kontenut lipidu tal-annimali tat-test jista' jiġi stabbilit fuq l-istess materjal bijoloġiku bħal dak użat sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test. Madankollu, huwa prattiku li jintużaw annimali tal-kontroll imdorrijin, tal-inqas fil-bidu, jew — idealment — fl-aħħar tal-fażi tat-teħid sabiex jitkejjel il-kontenut lipidu, li mbagħad jista' jintuża biex jiġu normalizzati l-valuri tal-BAF.

VALIDITÀ TAT-TEST

21. Sabiex test ikun validu japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— Il-mortalità kumulattiva tad-dud (kontrolli u trattamenti) sa tmiem it-test ma għandhiex taqbeż l-20 % tan-numru inizjali.

— Barra minn hekk, għandu jintwera li d-dud iħaffer fin-naqal sabiex jiġi espost sal-livell massimu. Għad-dettalji ara l-paragrafu 28.

▼M6

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Speċijiet tat-test

22. Għat-test jistgħu jintużaw bosta speċijiet ta' oligoċaeti akkwatiċi. L-iktar speċijiet użati spiss huma elenkati fl-Appendiċi 6.

23. It-testijiet tat-tossiċità (96 siegħa, fl-ilma biss) għandhom isiru f'intervalli regolari (eż. kull xahar) b'tossikant ta' referenza bħall-klorur tal-potassju (KCl) jew sulfat tar-ram ($CuSO_4$) (1) sabiex jintwerew il-kundizzjonijiet tas-saħħa tal-annimali tat-test (1)(6). Jekk it-testijiet tat-tossiċità ta' referenza ma jsirux kull ċertu żmien, il-lott tal-organiżmi li għandhom jintużaw f'test tal-bijoakkumulazzjoni tan-naqal għandu jiġi vverifikat bl-użu ta' tossikant ta' referenza. Il-kejl tal-kontenut lipidu jista' jservi wkoll ta' informazzjoni siewja dwar il-kundizzjoni tal-annimali.

Koltura tal-organiżmi tat-test

24. Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' dud għat-twettiq ta' testijiet tal-bijoakkumulazzjoni, id-dud jaf ikollu jinżamm f'koltura tal-laboratorju permanenti ta' speċi waħda. Il-metodi tal-koltura tal-laboratorju għall-ispeċi magħżula tat-test huma spjegati fil-qosor fl-Appendiċi 6. Għad-dettalji ara r-referenzi (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Apparat

25. Ara li tevita milli tuża materjali għall-partijiet kollha tat-tagħmir li jistgħu jinħallu, jassorbu sustanzi tat-test jew inixxu sustanzi oħrajn u għandhom effett avvers fuq l-annimali tat-test. Il-kompartimenti rettangolari jew ċilindriċi standard, magħmulin minn materjal kimikament inerti u b'kapaċità xierqa f'konformità mar-rata ta' tagħbija, jiġifieri jista' jintuża n-numru ta' dud tat-test. Għandu jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik rotob għall-għoti tal-ilma jew l-arja. Għandhom jintużaw politetrafluworoetilen, azzar inossidabbli u/jew ħġieġ għal kwalunkwe tagħmir li jidħol f'kuntatt mal-midjums tat-test. Għal sustanzi b'koeffiċjenti ta' assorbiment għoljin, bħal piretrojdi sintetiċi, jaf ikun meħtieġ ħġieġ silanizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet, it-tagħmir ikollu jintrema wara li jintuża (5). Għal sustanzi tat-test radjutikkettati, u għal sustanzi volatili, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat strippaġġ u l-ħruġ ta' sustanza tat-test strippata. Għandhom jintużaw nases (eż. fliexken tal-ħasil tal-gass tal-ħġieġ) li fihom assorbimenti xierqa biex iżommu kwalunkwe residwu li jevapora mill-kompartimenti tat-test (11).

Ilma

26. L-ilma tal-madwar irid ikun ta' kwalità li tippermetti li l-ispeċijiet tat-test jibqgħu ħajjin matul il-perjodi ta' akklimazzjoni u tat-test bla ma juru xi dehra jew imġiba anormali. Ilma rikostitwit skont il-metodu ta' ttestjar C.1 (25) huwa rrakkomandat sabiex jintuża bħala ilma tal-madwar fit-testijiet kif ukoll fil-kolturi tal-laboratorju tad-dud. Intwera li bosta speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu ħajjin, jikbru, u jirriproduċu f'dan l-ilma (8), u hija pprovduta standardizzazzjoni massima tal-kundizzjonijiet tat-test u tal-koltura. L-ilma għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-pH, il-kondottività u l-ebusija. L-analiżi tal-ilma għal mikroinkwinanti qabel l-użu tista' tipprovdi informazzjoni siewja (Appendiċi 4).

27. L-ilma għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu ta' test. Il-pH tal-ilma tal-madwar għandha tkun ta' bejn 6 u 9. L-ebusija totali għandha tkun ta' bejn 90 u 400 mg $CaCO_3$ għal kull litru fil-bidu tat-test (7). Il-meded għall-pH u l-ebusija fl-ilma rikostitwit imsemmi jingħataw fil-metodu ta' ttestjar C.1 (25). Jekk hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija

▼M6

u s-sustanza tat-test, għandu jintuża l-ilma bl-inqas ebusija. L-Appendiċi 4 jiġbor fil-qosor il-kriterji addizjonali ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli skont it-TG 210 tal-OECD (34).

Naqal

28. In-naqal irid ikun ta' kwalità li tippermetti s-sopravivenza u, idealment, ir-riproduzzjoni tal-organiżmi tat-test sad-durata tal-perjodi tad-drawwa u t-test bla ma juru xi dehra jew imġiba anormali. Id-dud għandu jħaffer fin-naqal. L-imġiba ta' tħaffir jista' jkollha influwenza fuq l-espożizzjoni, u konsegwentement fuq il-BAF. Għalhekk, imġiba ta' evitar jew tħaffir tan-naqal mill-organiżmi tat-test għandha tiġi rreġistrata, meta ċ-ċarezza tal-ilma tal-madwar tippermetti li jsiru osservazzjonijiet bħal dawn. Id-dud (kontroll u trattamenti) għandu jħaffer fin-naqal fi ħdan perjodu ta' 24 siegħa minn meta jiddaħħal fir-reċipjenti tat-test. Jekk jiġi osservat nuqqas ta' tħaffir jew evitar tan-naqal b'mod permanenti (eż. iktar minn 20 % tul iktar minn nofs il-fażi tat-teħid), dan jindika li jew il-kundizzjonijiet tat-test mhumiex xierqa, jew inkella l-organiżmi tat-test mhumiex b'saħħithom, jew li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tikkaġuna din l-imġiba. F'dan il-każ, it-test għandu jitwaqqaf u jerġa' jsir f'kundizzjonijiet aħjar. Informazzjoni addizzjonali dwar l-inġestjoni tan-naqal tista' tinkiseb bl-użu tal-metodi deskritti f'(35)(36), li jispeċifikaw l-inġestjoni tan-naqal jew l-għażla tal-partikoli fl-organiżmi tat-test. Jekk osservabbli, tal-inqas il-preżenza jew l-assenza ta' gerbub tar-rawt fuq il-wiċċ tan-naqal, li jindikaw inġestjoni tan-naqal mid-dud, trid tiġi rreġistrata u kkunsidrata fl-interpretazzjoni tar-riżutati tat-test fir-rigward tal-passaġġi ta' espożizzjoni.

29. Naqal artifiċjali bbażat fuq il-ħamrija artifiċjali deskritta fil-metodu ta' ttestjar C.8 (40) huwa rrakkomandat sabiex jintuża fiż-żewġ testijiet u fil-kolturi tal-laboratorju tad-dud (Appendiċi 5), peress li naqal naturali ta' kwalità xierqa jaf ma jkunx disponibbli tul is-sena. Barra minn hekk, l-organiżmi indiġeni kif ukoll il-preżenza possibbli ta' mikroinkwinanti f'naqal naturali jistgħu jinfluwenzaw it-test. Bosta speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu ħajjin, jikbru u jirriproduċu fin-naqal artifiċjali (8).

30. In-naqal artifiċjali għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-oriġini tal-kostitwenti, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-ħbub (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), il-kontenut ta' ilma, u l-pH. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox mhuwiex obbligatorju. Madankollu, naqal naturali minn siti mhux imniġġsin jista' jservi bħala naqal tat-test u/jew tal-koltura (1). Naqal naturali għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-oriġini (sit ta' ġbir), il-pH u l-ammonijaka tal-ilma tal-pori, il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal) u l-kontenut perċentwali ta' ilma (6). Huwa rrakkomandat li, qabel jiżdied bis-sustanza tat-test, in-naqal naturali jiġi kondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li huma prevalenti fit-test sussegwenti, jekk ikun mistenni li tiżviluppa l-ammonijaka. Fi tmiem dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Analiżi tan-naqal jew il-kostitwenti tiegħu għall-mikroinkwinanti qabel jintużaw tista' tipprovdi informazzjoni siewja.

Tħejjija

31. It-tqandil ta' naqal naturali qabel jintuża fil-laboratorju huwa deskritt f'(1)(6)(44). It-tħejjija tan-naqal artifiċjali hija deskritta fl-Appendiċi 5.

▼M6

Ħżin

32. In-naqal naturali għandu jinħażen fil-laboratorju għall-inqas żmien possibbli. L-EPA tal-Istati Uniti (6) tirrakkomanda perjodu massimu ta' ħżin ta' 8 ġimgħat f'4 ± 2 °C fid-dlam. Ma għandux ikun hemm spazju vojt fuqani fuq in-naqal fil-kontenituri tal-ħżin. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-ħżin ta' naqal artifiċjali jingħataw fl-Appendiċi 5.

Applikazzjoni tas-sustanza tat-test

33. In-naqal huwa miżjud mas-sustanza tat-test. Il-proċedura ta' żieda tinvolvi kisi ta' kostitwent wieħed jew iktar tan-naqal bis-sustanza tat-test. Pereżempju, ir-ramel kwarzuż, jew sehem minnu (eż. 10 g tar-ramel kwarzuż għal kull reċipjent tat-test), jistgħu jitgħaddsu f'soluzzjoni tas-sustanza tat-test f'solvent xieraq, li mbagħad tiġi evaporata bil-mod sabiex tinxef. Imbagħad, il-parti miksija tista' titħallat fin-naqal imxarrab. L-ammont ta' ramel ipprovdut mit-taħlita tas-sustanza tat-test u r-ramel irid jiġi kkunsidrat meta jitħejja n-naqal, jiġifieri, għalhekk, in-naqal għandu jitħejja b'inqas ramel (6).

34. B'naqal naturali, is-sustanza tat-test tista' tiddaħħal permezz ta' żieda ta' sehem imnixxef tan-naqal kif deskritt iktar 'il fuq għan-naqal artifiċjali, jew permezz ta' tħawwid tas-sustanza tat-test fin-naqal imxarrab, b'evaporazzjoni sussegwenti ta' kwalunkwe aġent solubilizzanti użat. Is-solventi xierqa għaż-żieda tan-naqal imxarrab huma l-etanol, il-metanol, l-etilen glikol monometil eter, l-etilen glikol dimetil eter, id-dimetilformamid u l-glikol tat-trietilen (5)(34). It-tossiċità u l-volatilità tas-solvent u s-solubilità tas-sustanza tat-test fis-solvent magħżul għandhom ikunu l-kriterji ewlenin għall-għażla ta' aġent solubilizzanti xieraq. F'Environment Canada (1995)(41) tingħata gwida addizzjonali dwar il-proċeduri ta' żieda. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li s-sustanza tat-test li tiddaħħal man-naqal titqassam sew u b'mod indaqs fin-naqal. Is-subkampjuni tal-irreplikati tan-naqal miżjud għandhom jiġu analizzati sabiex jiġu vverifikati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fin-naqal, u sabiex jiġi stabbilit il-grad ta' omoġenità tat-tqassim tas-sustanza tat-test.

35. Ladarba jkun tħejja n-naqal miżjud bl-ilma tal-madwar, idealment għandek tħalli s-sustanza tat-test tinqasam bejn in-naqal u l-fażi milwiema. L-aħjar ħaġa hija li dan isir fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u l-arja użati fit-test. Iż-żmien xieraq ta' ekwilibrazzjoni huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanza, u jista' jkun fl-ordni ta' sigħat sa jiem u f'każijiet rari jista' jieħu bosta ġimgħat (4-5 ġimgħat (28)(42). F'dan it-test, l-ekwilibriju mhuwiex mistenni iżda huwa rrakkomandat perjodu ta' ekwilibriju ta' 48 siegħa sa 7 ijiem. Skont l-iskop tal-istudju, eż, meta jkollhom jiġu imitati l-kundizzjonijiet ambjentali, in-naqal miżjud jista' jiġi ekwilibrat jew jitħalla jiqdiem għal perjodu itwal (11).

TWETTIQ TAT-TEST

Test preliminari

36. Jista' jkun siewi li jsir esperiment preliminari sabiex jiġu ottimizzati l-kundizzjonijiet tat-test definittiv, eż. għażla tal-konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test u d-durata tal-fażijiet ta' teħid u eliminazzjoni. L-imġiba tad-dud, pereżempju l-evitar tan-naqal, jiġifieri d-dud jaħrab min-naqal, xi ħaġa li tista' tkun ikkaġunata mis-sustanza tat-test u/jew min-naqal stess, għandha

▼M6

tiġi osservata u rreġistrata matul test preliminari. L-evitar tan-naqal jista' jintuża wkoll bħala parametru subletali f'test preliminari sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test li għandha tintuża f'test tal-bijoakkumulazzjoni.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni

Durata tal-fażi ta' teħid

37. L-organiżmi tat-test huma esposti għas-sustanza tat-test matul il-fażi ta' teħid. L-ewwel kampjun għandu jittieħed bejn 4 u 24 siegħa minn meta tibda l-fażi ta' teħid. Il-fażi ta' teħid għandha ddum għaddejja sa 28 jum (1)(6)(11) sakemm ma jkunx jista' jintwera li ntlaħaq ekwilibriju qabel. L-istat kostanti jseħħ meta: (1) plott tal-fatturi ta' bijoakkumulazzjoni f'kull perjodu ta' kampjunar kontra ż-żmien huwa parallel għall-assi taż-żmien; (ii) tliet analiżijiet suċċessivi tal-BAF li saru fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' tal-inqas jumejn ma jvarjawx minn xulxin b'iktar minn ± 20 %; u (iii) ma hemm ebda differenza sinifikanti bejn it-tliet perjodi ta' kampjunar (fuq il-bażi ta' paraguni statistiċi, eż. analiżi tal-varjanza u analiżi tar-rigressjoni). Jekk l-istat kostanti ma jkunx għadu ntlaħaq sal-jum 28, il-fażi ta' teħid tista' tintemm billi tinbeda l-fażi ta' eliminazzjoni, u l-BAF_K jista' jiġi kkalkolat mill-kostanti tar-rata ta' teħid u eliminazzjoni (ara wkoll il-paragrafi 16 sa 18).

Durata tal-fażi ta' eliminazzjoni

38. L-ewwel kampjun għandu jittieħed bejn 4 u 24 siegħa minn meta tibda l-fażi ta' eliminazzjoni, peress li matul il-perjodu inizjali, jistgħu jseħħu bidliet rapidi fir-residwu tat-tessut. Huwa rrakkomandat li tintemm il-fażi ta' eliminazzjoni meta l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tkun inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni ta' stat kostanti, jew inkella wara durata massima ta' 10 ijiem. Il-livell ta' residwu fid-dud fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni huwa rrapportat bħala punt ta' tmiem sekondarju. Madaknollu, il-perjodu jista' jkun irregolat mill-perjodu li fih il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud tibqa' ogħla mil-limitu ta' detezzjoni analitika.

Organiżmi tat-test

Numru ta' dud tat-test

39. In-numru ta' dud għal kull kampun irid jipprovdi massa ta' tessut tad-dud b'tali mod li l-massa tas-sustanza tat-test għal kull kampjun fil-bidu tal-fażi ta' teħid u fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni, rispettivament, tkun ferm ogħla mil-limitu ta' detezzjoni għas-sustanza tat-test f'materjal bijoloġiku. Fl-istadji msemmijin tal-fażijiet ta' teħid u eliminazzjoni, il-konċentrazzjoni fl-annimali tat-test normalment tkun relattivament baxxa (6)(8)(18). Peress li l-piż individwali f'ħafna speċijiet ta' oligoċaeti akkwatiċi huwa baxx ħafna (5-10 mg piż imxarrab għal kull individwu għal *Lumbriculus variegatus* u *Tubifex tubifex*), id-dud ta' kompartiment tat-test ta' rreplikat partikolari jista' jiġi raggruppat sabiex jintiżen u għal analiżi tas-sustanza kimika tat-test. Għal speċijiet tat-test b'piż individwali ikbar (eż. *Branchiura sowerbyi*) jistgħu jintużaw irreplikati li fihom individwu wieħed, iżda f'dawn il-każijiet in-numru ta' rreplikati għandu jiżdied għal ħamsa għal kull punt ta' kampjunar (11). Madankollu, ta' min jinnota li *B. sowerbyi* ma kienx inkluż fir-ringtest (12), u għalhekk mhuwiex rakkomandat bħala speċi ideali fil-metodu.

40. Għandu jintuża dud ta' daqs simili (għal *L. variegatus* ara l-Appendiċi 6). Għandu jkun ġej mill-istess sors, u għandu jkun adult jew kbir tal-istess klassi ta' età (ara l-Appendiċi 6). Il-piż u l-età ta' annimal jista' jkollhom effett sinifikanti fuq il-valuri tal-BAF (eż. minħabba kontenut lipidu differenti u/jew il-preżenza ta' bajd); dawn il-parametri għandhom jiġu rreġistrati bi preċiżjoni. Biex tkejjel il-piż xott u mxarrab medju għandu jintiżen subkampjun ta' dud qabel ma jibda t-test.

▼M6

41. B'*Tubifex tubifex* u *Lumbriculus variegatus*, ir-riproduzzjoni hija mistennija matul il-perjodu ta' ttestjar. Nuqqas ta' riproduzzjoni f'test ta' bijoakkumulazzjoni għandu jiġi rreġistrat, u kkunsidrat meta jiġu interpretati r-riżultati tat-test.

Tagħbija

42. Għandhom jintużaw proporzjonijiet għoljin ta' naqal għall-ilma u ilma għaddud sabiex jiġi mminimizzat it-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal matul il-fażi ta' teħid, u sabiex jiġi evitat tnaqqis fil-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt. Ir-rata ta' tagħbija magħżula għandha tkun tikkorrispondi wkoll għal densitajiet tal-popolazzjoni li jseħħu b'mod naturali tal-ispeċi magħżula (43). Pereżempju, għal *Tubifex tubifex* hija rrakkomandata rata ta' tagħbija ta' 1-4 mg ta' tessut tad-dud (piż imxarrab) għal kull gramma naqal imxarrab (8)(11). Ir-referenzi (1) u (6) jirrakkomandaw rata ta' tagħbija ta' ≤1 g piż xott tat-tessut tad-dud għal kull 50 g ta' karbonju organiku tan-naqal għal *L. variegatus*.

43. Id-dud li ser jintuża f'test jitneħħa mill-koltura billi n-naqal tal-koltura jingħadda minn passatur. L-annimali (dud adult jew kbir bla sinjali ta' frammentazzjoni riċenti) jiġu ttrasferiti f'dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma nadif. Jekk il-kundizzjonijiet tat-test ivarjaw mill-kundizzjonijiet tal-koltura, fażi ta' drawwa ta' 24 siegħa għandha tkun biżżejjed. Qabel jintiżen, id-dud għandu jitneħħielu l-ilma żejjed. Dan jista' jsir billi d-dud jitqiegħed bil-galbu fuq karta mxarrba minn qabel. Mhuwiex rakkomandat li tintuża karta assorbenti biex jitnixxef id-dud peress li din tista' tikkaġuna stress jew ħsara lid-dud. Brunson et al. (1998) irrakkomanda l-użu ta' dud mhux ixxottat b'taptip ta' madwar 1,33 darba ikbar mill-bijomassa fil-mira. Dan it-33 % addizzjonali jikkorrispondi għad-differenza bejn id-dud imnixxef bit-taptip u dak li mhuwiex (28).

44. Fil-bidu tal-fażi tat-teħid (jum 0 tat-test), l-orgniżmi tat- test jitneħħew mill-kompartiment ta' akklimatizzazzjoni u jitqassmu għal għarrieda f'reċipjenti (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma rikostitwit billi jiddaħħlu gruppi ta' żewġ dud f'kull reċipent, sakemm kull reċipjent ikun fih għaxar dud. Imbagħad, kull wieħed minn dawn il-gruppi jiġi ttrasferit għal għarrieda f'reċipjenti tat-test separati, eż. bl-użu ta' forċipi tal-azzar ħafif. Imbagħad ir-reċipjenti tat-test jiġu inkubati fil-kundizzjonijiet tat-test.

Tmigħ

45. Fid-dawl tal-kontenut baxx ta' nutrijenti tan-naqal artifiċjali, in-naqal għandu jiġi emendat b'sors tal-ikel. Sabiex ma tiġix sottovalutata l-espożizzjoni tal-organiżmi tat-test, eż. bit-tmigħ selettiv ta' ikel mhux kontaminat, l-ikel meħtieġ għar-riproduzzjoni u t-tkabbir tal-organiżmi tat-test għandu jiddaħħal fin-naqal darba qabel jew matul l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test (ara l-Appendiċi 5).

Proporzjon ta' naqal u ilma

46. Il-proporzjon ta' naqal u ilma rrakkomandat huwa ta' 1:4 (45). Dan il-proporzjon jitqies xieraq sabiex il-konċentrazzjonijiet ta' ossiġenu jinżammu f'livelli xierqa u sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni tal-ammonijaka fl-ilma tal-madwar. Il-kontenut ta' ossiġenu fl-ilma tal-madwar għandu jinżamm f'saturazzjoni ta' ≥ 40 %. L-ilma tal-madwar tar-reċipjenti tat-test għandu jingħata ftit arja (eż. 2 — 4 ibżieżaq fis-sekonda) permezz ta' pipetta pasteur imqiegħda madwar 2 cm 'il fuq mill-wiċċ tan-naqal sabiex tonqos kemm jista' jkun il-perturbazzjoni tan-naqal.

▼M6

Dawl u temperatura

47. Il-fotoperjodu fil-koltura u t-test huwa ta' 16-il siegħa (1)(6). L-intensità tad-dawl fiż-żona tat-test għandha tinżamm għal madwar 500-1 000 lx. It-temperatura għandha tinżamm 20 ± 2 °C matul it-test.

Konċentrazzjonijiet tat-test

48. Tintuża konċentrazzjoni waħda tat-test (l-inqas possibbli) sabiex tiġi stabbilita l-kinetika tat-teħid, iżda tista' tintuża konċentrazzjoni oħra (ogħla) (eż. (46)). F'dak il-każ, il-kampjuni jittieħdu u jiġu analizzati fi stat kostanti jew wara l-jum 28 sabiex jiġi kkonfermat il-BAF imkejjel fl-inqas konċentrazzjoni (11). Il-konċentrazzjoni superjuri għandha tingħażel sabiex ikunu jistgħu jiġu eskluži l-effetti avversi (eż. bl-għażla ta' madwar 1 % tal-inqas konċentrazzjoni tal-effett kroniku magħrufa EC_x kif derivata mill-istudji relevanti dwar it-tossiċità kronika). L-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun ferm ogħla mil-limitu ta' detezzjoni fil-kampjuni tan-naqal u bijoloġiċi bil-metodu analitiku użat. Jekk il-konċentrazzjoni tal-effett tas-sustanza tat-test tkun qrib il-limitu ta' detezzjoni analitiku, huwa rrakkomandat li tintuża sustanza tat-test radjutikkettata b'radjuattività speċifika għolja.

Irreplikati Ttrattati u tal-Kontroll

49. In-numru minimu ta' rreplikati ttrattati għall-kejliet kinetiċi għandu jkun tal-inqas tlieta għal kull punt ta' kampjunar (11) matul il-fażi ta' teħid u eliminazzjoni. Irreplikati addizzjonali għandhom jintużaw eż. għal dati ta' kampjunar addizzjonali mhux obbligatorji. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, jitħejja numru ndaqs ta' rreplikati b'naqal mhux miżjud u ilma tal-madwar, sabiex id-dud ittrattat ikun jista' jiġi ttrasferit mir-reċipjenti ttrattati magħżulin f'reċipjenti mhux ittrattati fi tmiem il-fażi tat-teħid. In-numru totali ta' rreplikati ttrattati għandu jkun biżżejjed kemm għall-fażi ta' teħid kif ukoll għal dik ta' eliminazzjoni.

50. Inkella, id-dud magħżul għall-kampjunar matul il-fażi ta' eliminazzjoni jista' jkun espost f'kontenitur kbir li fih naqal miżjud tal-istess lott bħal dak użat għall-kinetika tat-teħid. Għandu jintwera li l-kundizzjonijiet tat-test (eż. fond tan-naqal, proporzjon ta' ilma/naqal, tagħbija, temperatura, kwalità tal-ilma) huma paragunabbli għall-irreplikati magħżulin għall-fażi tat-teħid. Fi tmiem il-fażi tat-teħid, il-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud għandhom jittieħdu minn dan il-kontenitur sabiex jiġu analizzati, u għandu jitneħħa numru suffiċjenti ta' dud kbir li ma juri ebda sinjal ta' frammentazzjoni riċenti biex jiġi ttrasferit fl-irrepikati mħejjin għall-fażi ta' eliminazzjoni (eż. għaxar organiżmi għal kull reċipjent tal-irreplikati).

51. Jekk ma jintuża ebda solvent ieħor għajr l-ilma, għandhom jiġu pprovduti tal-inqas 9 irreplikati ta' kontroll negattiv (tal-inqas 3 kampjunati fil-bidu, 3 fi tmiem it-teħid u 3 fi tmiem l-eliminazzjoni) għal analiżi bijoloġika u tal-isfond. Jekk jintuża xi aġent solubilizzanti għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, għandu jsir kontroll bis-solvent (tal-inqas 3 irreplikati għandhom jiġu kampjunati fil-bidu, 3 fi tmiem il-fażi tat-teħid, u 3 fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni). F'dan il-każ, tal-inqas għandhom jiġu pprovduti 4 irreplikati ta' kontroll negattiv (ebda solvent) għall-kampjunar fi tmiem il-fażi tat-teħid. Dawn l-irreplikati jistgħu jitqabblu bijoloġikament mal-kontroll bis-solvent sabiex tinkiseb informazzjoni fuq l-influwenza possibbli tas-solvent fuq l-organiżmi tat-test. Id-dettalji jingħataw fl-Appendiċi 3.

▼M6

Il-frekwenza tal-kejliet tal-kwalità tal-ilma

52. Tal-inqas, għandhom jitkejlu l-parametri tal-ilma li ġejjin fl-ilma tal-madwar matul il-fażi ta' teħid u eliminazzjoni:

It-temperatura	f'reċipjent wieħed ta' kull livell tat-trattament għal kull data tal-kampjunar, u f'reċipjent wieħed tal-kontroll fil-ġimgħa u fil-bidu u tmiem il-perjodu ta' teħid u eliminazzjoni; tista' tiġi rreġistrata wkoll it-temperatura fil-midjum tal-madwar (arja ambjentali jew banjumarija) jew f'reċipjent rappreżentattiv wieħed tat-test eż. f'intervalli kontinwi jew fis-siegħa;
Il-kontenut ta' ossiġenu dissolt	f'reċipjent wieħed ta' kull livell tat-trattament, u f'reċipjent tal-kontroll wieħed għal kull data ta' kampjunar; mogħti bħala mg/L u % ASV (valur tas-saturazzjoni tal-arja);
Il-provvista tal-arja	kkontrollata tal-inqas darba kuljum (jiem tax-xogħol) u aġġustata jekk ikun hemm bżonn;
Il-pH	f'reċipjent ittrattat wieħed ta' kull livell tat-trattament għal kull data tal-kampjunar, u f'reċipjent wieħed tal-kontroll fil-ġimgħa u fil-bidu u tmiem il-perjodu ta' teħid u eliminazzjoni;
L-ebusija totali tal-ilma	tal-inqas f'reċipjent ittrattat wieħed u reċipjent tat-test tal-kontroll fil-bidu u fi tmiem il-perjodu tat-teħid u ta' eliminazzjoni, mogħti bħala mg/l $CaCO_3$;
Il-kontenut totali ta' ammonijaka	tal-inqas f'reċipjent ittrattat wieħed u reċipjent tat-test tal-kontroll wieħed fil-bidu u fi tmiem il-perjodu ta' teħid u eliminazzjoni; mogħti bħala mg/l NH_4^+ jew NH_3 jew l-ammonijaka totali-N.

Kampjunar u analiżi tad-dud, in-naqal u l-ilma

Skeda tal-Kampjunar

53. Fl-Appendiċi 3 jingħataw eżempji tal-iskedi ta' kampjunar għal fażi ta' teħid ta' 28 jum u fażi ta' eliminazzjoni ta' 10 ijiem.

54. Ħu kampjun tal-ilma u n-naqal mill-kompartimenti tat-test sabiex tistabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test qabel ma jiddaħħal id-dud, u matul il-fażi ta' teħid kif ukoll ta' eliminazzjoni. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test jiġu stabbiliti fid-dud, in-naqal u l-ilma sabiex jiġi ssorveljat it-tqassim tas-sustanza tat-test fil-kompartimenti tas-sistema tat-test.

55. Ħu kampjun tad-dud, in-naqal u l-ilma tal-inqas sitt darbiet matul il-fażi tat-teħid kif ukoll dik ta' eliminazzjoni.

56. Kompli ħu kampjuni sakemm jiġi stabbilit plateau (stat kostanti) (ara l-Appendiċi 1) jew għal 28 jum. Jekk il-plateau ma jintlaħaqx fi żmien 28 jum, ibda bil-fażi ta' eliminazzjoni. Meta tibda l-fażi ta' eliminazzjoni, ittrasferixxi d-dud magħżul biex tirreplika l-kompartimenti li fihom naqal mhux ittrattat u ilma (ara wkoll il-paragrafi 17 u 18).

Kampjunar u tħejjija tal-kampjun

57. Ikseb kampjuni tal-ilma b'dekantazzjoni, tbattil b'pajp jew pipetta ta' volum suffiċjenti biex tkun tista' tkejjel il-kwantità tas-sustanza tat-test fil-kampjun.

58. L-ilma tal-madwar li jifdal jiġi dekantat jew jitbattal b'pajp bil-galbu mill-kompartiment(i) tat-test. Il-kampjuni tan-naqal għandhom jittieħdu bil-galbu, b'tali mod li jikkaġunaw tfixkil minimu lid-dud.

▼M6

59. Neħħi d-dud kollu mill-irreplikat tat-test fil-ħin tal-kampjunar, eż. billi tissospendi n-naqal bl-ilma tal-madwar u tifrex il-kontenuti ta' kull irreplikat fuq trej baxxa u billi taqbad id-dud billi tuża forċipi tal-azzar artab. Laħlaħhom malajr bl-ilma fi trej baxxa tal-ħġieġ jew tal-azzar. Neħħi l-ilma żejjed. Ittrasferixxi d-dud bil-galbu f'reċipjent li ntiżen minn qabel u iżinhom. Issagrifika d-dud billi tiffriża (eż. ≤ – 18 °C). Il-preżenza u n-numru ta' fosdqiet tal-larva u/jew żgħar għandhom jiġu rreġistrati.

60. B'mod ġenerali, id-dud għandu jintiżen u jiġi ssagrifikat eżatt wara l-kampjunar mingħajr faži ta' żvujtar tal-imsaren biex jinkiseb BAF konservattiv li jinkludi kontenut kontaminat tal-imsaren, u jiġi evitat it-telf tar-residwi tal-ġisem matul kwalunkwe perjodu ta' żvujtar tal-imsaren fl-ilma biss (8). Sustanzi b'log K_{ow} ta' iktar minn 5 mhumiex mistennijin li jiġu eliminati b'mod sinifikanti matul xi perjodu ta' żvujtar tal-imsaren fl-ilma biss, filwaqt li sustanzi b'log Kow ta' inqas minn 4 jistgħu jintilfu f'ammonti notevoli (47).

61. Matul il-faži ta' eliminazzjoni, id-dud jiżvojta l-imsaren tiegħu f'naqal nadif. Dan ifisser li l-kejliet eżatt qabel il-faži ta' eliminazzjoni jinkludu naqal bl-imsaren ikkontaminat, filwaqt li wara l-ewwel 4-24 siegħa tal-faži ta' eliminazzjoni, ħafna mill-kontenut tal-imsaren ikkontaminat huwa supponut li jkun ġie sostitwit minn naqal nadif (11)(47). Imbagħad, il-konċentrazzjoni fid-dud ta' dan il-kampjun tista' titqies bħala l-konċentrazzjoni tat-tessut wara l-iżvujtar tal-imsaren. Biex jingħata kont għad-dilwizzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal mhux ikkontaminat matul il-faži ta' eliminazzjoni, il-piż tal-kontenut tal-imsaren jista' jiġi stmat mill-proporzjonijiet tal-piż imxarrab tad-dud/piż tal-irmied tad-dud jew il-piż xott tad-dud/piż tal-irmied tad-dud.

62. Jekk l-iskop ta' studju speċifiku jkun li jkejjel il-bijodisponibilità u r-residwi tat-tessuti veri fl-organiżmi tat-test, f'dak il-każ tal-inqas subkampjun ta' annimali ttrattati (eż. mit-tliet reċipjenti tal-irreplikati addizzjonali), idealment kampjunati matul stat kostanti, għandhom jintiżnu, jiżvojtaw f'ilma nadif għal perjodu ta' 6 sigħat (47), u jerġgħu jintiżnu qabel l-analiżi. Imbagħad, id-dejta dwar il-piż tad-dud u l-konċentrazzjoni fil-ġisem ta' dan is-subkampjun tista' titqabbel mal-valuri miksubin minn dud li ma żvojtax. Id-dud magħżul sabiex titkejjel l-eliminazzjoni ma għandux jiżvojta qabel it-trasferiment f'naqal nadif sabiex jiġi mminimizzat l-istress żejjed għall-annimali.

63. Idealment analizza l-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud eżatt (jiġifieri fi żmien jum sa jumejn) wara t-tneħħija sabiex tevita degradazzjoni jew telf ieħor u tikkalkola r-rati ta' teħid u eliminazzjoni approssimati int u tipproċedi bit-test. Analiżi minnufih tevita wkoll dewmien fl-istabbiliment ta' jekk intlaħaqx plateau.

64. Jekk ma ssirx analiżi minnufih, il-kampjuni għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Ikseb informazzjoni dwar l-istabbiltà u l-kundizzjonijiet xierqa ta' ħżin għas-sustanza tat-test partikolari qabel tibda l-istudju, (eż. id-durata u t-temperatura tal-ħżin, il-proċeduri ta' estrazzjoni, eċċ.). Jekk it-tali informazzjoni ma tkunx disponibbli u jiġi ġġudikat li hija neċessarja, jistgħu jsiru tessuti tal-kontroll miżjudin fl-istess ħin sabiex tiġi stabbilita l-istabbiltà tal-ħżin.

Kwalità tal-metodu analitiku

65. Peress li essenzjalment il-proċedura sħiħa hija rregolata mill-preċiżjoni, ir-reqqa u s-sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza tat-test, ivverifika bl-esperimenti li l-preċiżjoni u r-riproduċibilità tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza tat-test mill-kampjuni tal-ilma, in-naqal u

▼M6

d-dud huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari. Barra minn hekk, għandek tivverifika li s-sustanza tat-test ma tinsabx fil-kompartimenti tal-kontroll f'konċentrazzjonijiet ogħla mill-isfond. Jekk ikun hemm bżonn, ikkoreġi l-valuri ta' C_w, C_s u C_a għall-irkupri u l-valuri ta' sfond tal-kontrolli. Qandel il-kampjuni kollha matul it-test b'tali mod li tnaqqas kemm jista' jkun il-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw mill-assorbiment tas-sustanza tat-test fuq l-apparat tal-kampjunar).

66. L-irkupru ġenerali u l-irkupru tas-sustanza tat-test fid-dud, in-naqal, l-ilma u, jekk jintużaw, fin-nases li fihom l-assorbenti biex iżommu s-sustanza tat-test evaporata, għandhom jiġu rreġistrati u rrapportati.

67. Peress li huwa rrakkomandat li jintużaw sustanzi radjutikkettati, huwa possibbli li tiġi analizzata r-radjuattività totali (jiġifieri l-prodotti prinċipali u ta' degradazzjoni). Madankollu, jekk din tkun analitikament fattibbli, il-kwantifikazzjoni tas-sustanza prinċipali u l-prodotti ta' degradazzjoni fi stat kostanti jew fi tmiem il-fażi tat-teħid tista' tipprovdi informazzjoni importanti. Jekk huwa maħsub li ser isiru t-tali kejliet, il-kampjuni għandhom jiġu soġġetti għal proċeduri xierqa ta' estrazzjoni sabiex is-sustanza prinċipali tkun tista' tiġi kkwantifikata għaliha. Meta prodott ta' degradazzjoni identifikat ikun jirrappreżenta perċentwal importanti (eż. > 10 %) mir-radjuattività mkejla fl-organiżmi tat-test fi stat kostanti jew fi tmiem il-fażi tat-teħid, huwa rrakkomandat li jiġu identifikati t-tali prodotti ta' degradazzjoni (5).

68. Minħabba bijomassa individwali baxxa, spiss ma jkunx possibbli li tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'kull dudu individwali, sakemm ma tintużax Branchiura sowerbyi (40-50 mg piż imxarrab għal kull dudu) bħala speċi tat-test (11). Għaldaqstant, ir-raggruppament tal-individwi kampjunati minn reċipjent tat-test partikolari huwa aċċettabbli, iżda dan jillimita l-proċeduri statistiċi li jistgħu jiġu applikati għad-dejta. Jekk proċedura statistika speċifika u s-saħħa huma kunsiderazzjonijiet importanti, f'dak il-każ fit-test għandu jiġi inkluż numru adegwat ta' annimali tat-test u/jew kompartimenti tat-test tal-irreplikati sabiex jilqgħu ir-raggruppament, proċedura u saħħa meħtieġa.

69. Huwa rrakkomandat li l-BAF jingħata kemm bħala funzjoni tal-piż imxarrab totali u l-piż xott totali kif ukoll, meta meħtieġ (eż. għal sustanzi ferm lipofiliċi) bħala funzjoni tal-kontenut lipidu u t-TOC tan-naqal. Għandhom jintużaw metodi xierqa sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu (48)(49). It-teknika ta' estrazzjoni bil-kloroform/metanol (50) tista' tkun irrakkomandata bħala metodu standard (48). Madankollu, biex tevita milli tuża solventi klorinati, tista' tintuża modifika ringtested tal-metodu Bligh & Dyer (50) kif deskritt f'(51). Peress li bosta metodi ma jagħtux l-istess valuri (48), importanti li tispjega l-metodu użat fid-dettall. Meta jkun possibbli, jiġifieri jekk ikun hemm biżżejjed tessut tad-dud, il-kontenut lipidu jitkejjel fl-istess kampjun jew estratt bħal dak prodott għall-analiżi tas-sustanza tat-test, peress li spiss il-lipidi jkunu jridu jitneħħew mill-estratt qabel jiġi analizzat bi kromatografija (5). Madankollu, huwa prattiku li jintużaw annimali tal-kontroll imdorrijin tal-inqas fil-bidu jew — idealment — fi tmiem il-fażi tat-teħid sabiex jitkejjel il-kontenut lipidu, eż. fi tliet kampjuni.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

70. Il-kurva tat-teħid tas-sustanza tat-test tinkiseb billi fl-iskala aritmetika tipplottja l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud/fuqu matul il-fażi

▼M6

tat-teħid kontra ż-żmien. Jekk il-kurva laħqet plateau, ikkalkola l-BAF_{ss} tal-istat kostanti:

$$\frac{C_a \text{ fi stat kostanti jew fil} - \text{jum } 28(\text{medja})}{C_s \text{ fi stat kostanti jew fil} - \text{jum } 28(\text{medja})}$$

71. Stabbilixxi l-fattur tal-bijoakkumulazzjoni kinetika (BAFK) bħala l-proporzjon ks/ke. Normalment il-kostanti ta' eliminazzjoni (ke) jiġi stabbilit mill-kurva ta' eliminazzjoni (jiġifieri plott tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud matul il-fażi ta' eliminazzjoni). Imbagħad il-kostanti tar-rata tat-teħid ks jiġi kkalkolat mill-kinetika tal-kurva tat-teħid. Il-metodu ppreferit għall-kisba tal-BAFK u l-kostanti tar-rata, ks u ke, huwa li jintużaw metodi ta' stima tal-parametri mhux lineari fuq kompjuter (ara l-Appendiċi 2). Jekk l-eliminazzjoni ovvjament mhijiex l-ewwel ordni, f'dak il-każ għandhom jitħaddmu mudelli iktar kumplessi (25)(27)(52).

72. Il-fattur ta' akkumulazzjoni tan-naqal-bijota (BSAF) huwa stabbilit billi jiġi normalizzat il-BAFK għall-kontenut lipidu tad-dud u l-kontenut ta' karbonju organiku totali tan-naqal.

Interpretazzjoni tar-riżultati

73. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati bil-galbu meta l-konċentrazzjonijiet imkejlin tal-konċentrazzjonijiet tat-test iseħħu f'livelli qrib il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu analitiku użat.

74. Kurvi ta' teħid u eliminazzjoni ddefiniti ċari huma indikazzjoni ta' dejta dwar il-bijoakkumulazzjoni ta' kwalità tajba. Ġeneralment, il-limiti tal-kunfidenza għall-valuri tal-BAF minn studji ddiżinjati kif suppost ma jaqbżux il-25 % (5).

Rapport tat-test

75. Ir-rapport tat-test irid ikun jinkludi l-informazzjoni li ġejja.

Sustanza tat-test

— l-għamla fiżika u, il-karatteristiċi fiżikokimiċi, eż. il-log K_{ow}, is-solubilità fl-ilma;

— dejta dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika; is-sors tas-sustanza tat-test, l-identità u l-konċentrazzjoni ta' kwalunkwe solvent użat;

— jekk radjutikkettata, il-pożizzjoni eżatta tal-atomi tikkettati, ir-radjuattività speċifika, u l-perċentwal ta' radjuattività assoċjata mal-impuritajiet.

Speċijiet tat-test

— l-isem xjentifiku, ir-razza, is-sors, kwalunkwe pretrattament, l-akklimazzjoni, l-età, il-medda ta' daqsijiet, eċċ..

Kundizzjonijiet tat-test

— il-proċedura tat-test użata (eż. statiku, semistatiku jew bi fluss kontinwu);

— it-tip u l-karatteristiċi tal-illuminazzjoni użata u l-fotoperjodu/i;

— id-disinn tat-test (eż. in-numru, il-materjal u d-daqs tal-kompartimenti tat-test, il-volum ta' ilma, il-massa u l-volum tan-naqal, ir-rata ta' sostituzzjoni tal-volum ta' ilma (għal proċeduri bi fluss kontinwu jew semistatiċi), kwalunkwe arja li tingħata qabel u matul it-test, in-numru ta' rreplikati, in-numru ta' dud għal kull irreplikat, in-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, it-tul tal-fażijiet ta' teħid u eliminazzjoni, il-frekwenza tal-kampjunar);

▼M6

— il-metodu ta' tħejjija u applikazzjoni tas-sustanza tat-test kif ukoll ir-raġunijiet għall-għażla ta' metodu speċifiku;

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test;

— is-sors tal-kostitwenti tal-ilma u n-naqal artifiċjali jew — jekk jintużaw midjums naturali — l-oriġini tal-ilma u n-naqal, deskrizzjoni ta' kwalunkwe pretrattament, ir-riżultati ta' kwalunkwe wiri tal-ħila tal-annimali tat-test sabiex jgħixu u/jew jirriproduċu fil-midjums użati, il-karatteristiċi tan-naqal (il-pH u l-ammonijaka tal-ilma tal-pori (naqal naturali), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal), il-kontenut perċentwali ta' ilma, u kwalunkwe kejl ieħor li sar) u l-karatteristiċi tal-ilma (il-pH, l-ebusija, il-kondottività, it-temperatura, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt, il-livelli ta' klorur residwu (jekk imkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li sar);

— il-piż xott nominali u mkejjel f' % ta' piż imxarrab (jew il-proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) tan-naqal artifiċjali; il-piż xott imkejjel f' % tal-piż imxarrab (jew il-proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) għal naqal mill-għelieqi;

— il-kwalità tal-ilma fi ħdan il-kompartimenti tat-test kif ikkaratterizzata mit-temperatura, il-pH, l-ammonijaka, l-ebusija totali u l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt;

— informazzjoni ddettaljata dwar it-trattament tal-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud, inklużi dettalji dwar it-tħejjija, il-ħżin, il-proċeduri ta' żieda, l-estrazzjoni u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sustanzatat-test u l-kontenut lipidu, u l-irkupru tas-sustanza tat-test.

Riżultati

— il-mortalità tad-dud tal-kontroll u d-dud f'kull kompartiment tat-test u kwalunkwe effett subletali osservat inkluża mġiba anormali (eż., evitar tan-naqal, il-preżenza jew l-assenza ta' gerbub tar-rawt, nuqqas ta' riproduzzjoni);

— il-piż xott imkejjel f' % ta' piż imxarrab (jew proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) tan-naqal u l-organiżmi tat-test (utli għan-normalizzazzjoni);

— il-kontenut lipidu tad-dud;

— kurvi li juru l-kinetika tat-teħid u l-eliminazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud, u ż-żmien sal-istat kostanti;

— C_a, C_s u C_w (b'devjazzjoni u medda standard, jekk xieraq) għaż-żminijiet kollha tal-kampjunar (C_a fi g kg^{-1} piż imxarrab u xott tal-ġisem sħiħ, C_s mogħti f'g kg^{-1} piż imxarrab u xott tan-naqal, u C_w f'mg l^{-1}). Jekk huwa meħtieġ fattur ta' akkumulazzjoni tal-bijota-naqal (BSAF; ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni) (eż. għal paragun tar-riżultati minn żewġ testijiet jew iktar imwettqin b'annimali b'kontenut lipidu differenti), C_a għandu jingħata wkoll bħala g kg-1 kontenut lipidu tal-organiżmu, u C_s għandu jingħata bħala g kg^{-1} karbonju organiku (OC) tan-naqal;

— BAF (mogħti f'kg naqal imxarrab kg^{-1} dud imxarrab), il-kostanti tar-rata tat-teħid tan-naqal k_s (mogħti f'g naqal imxarrab kg^{-1} tad-dud imxarrab j^{-1}), u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni k_e (mogħti fil-j^{-1}); il-BSAF (mogħti f'kg OC tan-naqal kg^{-1} kontenut lipidu tad-dud) jista' jiġi rrapportat ukoll;

▼**M6**

— Residwi mhux eliminati (NER) fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni;

— jekk jitkejlu: il-perċentwali tas-sustanza prinċipali, il-prodotti ta' degradazzjoni, u r-residwi maqbudin (jiġifieri l-perċentwal tas-sustanza tat-test li ma jistax jiġi estratt b'metodi komuni ta' estrazzjoni) identifikati fl-annimali tat-test;

— il-metodi użati għal analiżijiet statistiċi tad-dejta.

Evalwazzjoni tar-riżultati

— il-konformità tar-riżultati mal-kriterji ta' validità kif elenkat fil-paragrafu 21;

— riżultati mhux mistennijin jew mhux tas-soltu, eż. eliminazzjoni mhux sħiħa tas-sustanza tat-test mill-annimali tat-test; f'dawn il-każijiet, ir-riżultati minn kwalunkwe studju preliminari jistgħu jipprovdi informazzjoni siewja.

▼M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet u unitajiet

Naqal artifiċjali, jew naqal ifformulat, rikostitwit jew sintetiku huwa taħlita ta' materjali użati biex jimitaw il-komponenti fiżiċi ta' naqal naturali.

Il-**bijoakkumulazzjoni** hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organiżmu jew fuq organiżmu b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar. Ir-riżultati tal-bijoakkumulazzjoni kemm mill-proċess ta' bijokonċentrazzjoni kif ukoll ta' bijofokalizzazzjoni (ara iktar 'il quddiem).

Il-**fattur ta' bijoakkumulazzjoni** (BAF) fi kwalunkwe waqt matul il-fażi tat-teħid ta' dan it-test ta' bijoakkumulazzjoni huwa l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organiżmu tat-test jew fuqu (C_a f'g kg^{-1} piż xott jew imxarrab) diviża bil-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-midjum tal-madwar (C_s bħala g kg^{-1} tal-piż imxarrab jew xott tan-naqal). Sabiex isir riferiment għall-unitajiet ta' C_a u C_s, il-BAF għandu l-unitajiet ta' kg naqal kg^{-1} dudu (15).

Il-**fatturi ta' bijoakkumulazzjoni** kkalkolati direttament mill-proprozjon tal-kostanti tar-rata tat-teħid tan-naqal diviż bil-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_s u k_e, rispettivament — ara iktar 'il quddiem) jissejħu l-fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K).

Il-**bijokonċentrazzjoni** hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organiżmu jew fuqu, li tirriżulta esklussivament mit-teħid permezz tal-wiċċ tal-ġisem, b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar.

Il-**bijofokalizzazzjoni** hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jew f'organiżmu jew fuqu, li tirriżulta primarjament mit-teħid minn ikel jew priża kontaminati, b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel jew il-priża. Il-bijofokalizzazzjoni tista' twassal għal trasferiment jew akkumulazzjoni tas-sustanza tat-test fi ħdan il-ktajjen alimentari.

Il-**fattur ta' akkumulazzjoni tal-bijota-naqal** (BSAF) huwa l-konċentrazzjoni tal-istat kostanti normalizzata għal-lipidi tas-sustanza tat-test f'organiżmu tat-test jew fuqu diviża bil-konċentrazzjoni normalizzata għall-karbonju organiku tas-sustanza fin-naqal fi stat kostanti. Imbagħad C_a jingħata bħala g kg^{-1} kontenut lipidu tal-organiżmu, u C_s bħala g kg^{-1} kontenut organiku tan-naqal.

Il-**perjodu ta' kundizzjonament** jintuża biex jiġi stabbilit il-komponent mikrobjali tan-naqal u titneħħa eż. ammonijaka li toriġina mill-komponenti tan-naqal; iseħħ qabel ma tiżdied is-sustanza tat-test man-naqal. Normalment, l-ilma tal-madwar jintrema wara l-kundizzjonament.

L-**eliminazzjoni** ta' sustanza tat-test hija t-telf ta' din is-sustanza mit-tessut tal-organiżmu tat-test bi proċessi attivi jew passivi li jseħħ indipendentement mill-preżenza jew l-assenza tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar.

Il-**fażi ta' eliminazzjoni** hija ż-żmien, wara t-trasferiment tal-organiżmi tat-test minn midjum kontaminat għal midjum ħieles mis-sustanza tat-test, li matulu tiġi studjata l-eliminazzjoni (jew it-telf nett) tas-sustanza mill-organiżmi tat-test.

Il-**kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni** (k_e) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organiżmu tat-test/fuqu, wara t-trasferiment tal-organiżmi tat-test minn midjum li fih is-sustanza tat-test għal midjum ħieles mis-sustanza kimika; k_e jingħata mogħti fil-d^{-1}.

▼M6

Il-**perjodu ta' ekwilibrazzjoni** jintuża biex is-sustanza tat-test tkun tista' titqassam bejn il-faži solida, l-ilma tal-pori u l-ilma tal-madwar; iseħħ wara li s-sustanza tat-test tiżdied man-naqal u qabel ma jiddaħħlu l-organiżmi tat-test.

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma** (K_{ow}) huwa l-proporzjon tas-solubilità ta' sustanza fl-n-ottanol u fl-ilma f'ekwilibriju, xi kultant mogħti bħala P_{ow}. Il-logaritmu ta' K_{ow} (log K_{ow}) jintuża bħala indikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organiżmi akwatiċi.

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju organiku/ilma** (K_{oc}) huwa l-proporzjon tal-konċentrazzjoni ta' sustanza fuq jew fil-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' naqal u l-konċentrazzjoni tas-sustanza fl-ilma f'ekwilibriju.

L-**ilma tal-madwar** huwa l-ilma li jinsab fuq in-naqal fir-reċipjent tat-test.

Plateau jew **stat kostanti** huwa ddefinit bħala l-ekwilibriju bejn il-proċessi ta' teħid u eliminazzjoni li jseħħu fl-istess ħin matul il-faži ta' espożizzjoni. L-istat kostanti jintlaħaq fil-plott tal-BAF f'kull perjodu ta' kampjunar kontra ż-żmien meta l-kurva ssir parallela għall-assi taż-żmien u tliet analiżijiet suċċessivi tal-BAF li jsiru fuq kampjuni meħudin f'intervalli tal-inqas jumejn ikunu fi ħdan 20 % minn xulxin, u ma jkun hemm ebda differenza statistikament importanti fost it-tliet perjodi ta' kampjunar. Għas-sustanzi tat-test li jittieħdu bil-mod, intervalli ta' sebat ijiem ikunu iktar xierqa (5).

Ilma tal-pori jew ilma interstizjali huwa l-ilma li jokkupa l-ispazju bejn in-naqal jew il-partikoli tal-ħamrija.

Il-**kostanti tar-rata ta' teħid tan-naqal** (k_s) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organiżmu tat-test jew fuqu li tirriżulta mit-teħid mill-faži tan-naqal. k_s jingħata fi g naqal kg^{-1} dud d^{-1}.

In-**naqal miżjud** huwa n-naqal li fih tiddaħħal is-sustanza tat-test.

Il-**fattur ta' bijoakkumulazzjoni fi stat kostanti** (BAF_{ss}) huwa l-BAF fi stat kostanti u li ma jinbidilx ħafna matul perjodu itwal ta' żmien, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar (C_s bħala g kg^{-1} tal-piż imxarrab jew xott tan-naqal) li tkun kostanti matul dan il-perjodu ta' żmien.

Il-**faži ta' teħid jew espożizzjoni** hija ż-żmien li matulu l-organiżmi tat-test ikunu esposti għas-sustanza tat-test.

▼M6

Appendiċi 2

Kalkolu tal-parametri tat-teħid u l-eliminazzjoni

Il-punt ta' tmiem ewlieni ta' test ta' bijoakkumulazzjoni huwa l-fattur ta' bijoakkumulazzjoni, BAF. Il-BAF imkejjel jista' jiġi kkalkolat billi tiġi diviża l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organiżmu tat-test, C_a, bil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal, C_s, fi stat kostanti. Jekk l-istat kostanti ma jintlaħaqx matul il-fażi tat-teħid, il-BAF jiġi kkalkolat bl-istess mod għall-jum 28. Madankollu, għandu jiġi indikat jekk il-BAF huwiex ibbażat fuq konċentrazzjonijiet fi stat kostanti jew le.

Il-mezz ippreferut sabiex jinkisbu l-fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K), il-kostanti tar-rata ta' teħid tan-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) huwa li jintużaw metodi ta' stima tal-parametri mhux lineari fuq kompjuter. Minħabba l-medda ta' żmien tal-fatturi medji ta' akkumulazzjoni (C_a, il-valuri medji ta' kull data ta' kampjunar/C_s, il-valuri medji ta' kull data ta' kampjunar = AF) tal-fażi tat-teħid fuq il-bażi tal-piż imxarrab tad-dud u tan-naqal, u l-ekwazzjoni mudell

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[ekwazzjoni 1]}$$

fejn AF(t) huwa l-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud u l-konċentrazzjoni tagħha fin-naqal fi kwalunkwe waqt (t) tal-fażi tat-teħid, dawn il-programmi tal-kompjuter jikkalkolaw il-valuri għall-BAF_K, k_s u k_e.

Meta jintlaħaq l-istat kostanti matul il-fażi tat-teħid (jiġifieri $t = \infty$), l-ekwazzjoni 1 tista' titnaqqas għal:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[ekwazzjoni 2]}$$

fejn

k_s = il-kostanti tar-rata tat-teħid fit-tessut [g naqal kg^{-1} dud d^{-1}]

k_e = il-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni [d^{-1}]

Imbagħad $k_s/k_e \times C_s$ huwa approċċ għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-tessut tad-dud fi stat kostanti ($C_{a,ss}$).

Il-Fattur ta' Akkumulazzjoni ta' Bijota-Naqal (BSAF) għandu jiġi kkalkolat kif ġej:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

fejn foc hija l-frazzjoni tal-karbonju organiku tan-naqal, u l-flip hija l-frazzjoni tal-lipidu tad-dud, bit-tnejn li huma bbażati fuq piż xott jew inkella fuq piż imxarrab.

Minħabba l-medda ta' żmien tal-valuri tal-konċentrazzjoni, il-kinetika tal-konċentrazzjoni tista' tiġi mmudellata bl-użu tal-ekwazzjonijiet mudell li ġejjin u metodu ta' stima tal-parametru mhux lineari bbażat fuq kalkolu bil-kompjuter.

Ir-residwu mkejjel medju tal-ġisem fi tmiem il-fażi tat-teħid huwa rrakkomandat bħala l-punt tat-tluq predefinit. L-użu tal-valur immudellat/stima mill-fażi tat-teħid għandu jsir biss, eż., jekk il-valur imkejjel ivarja b'mod sinifikanti mir-residwu tal-ġisem immudellat. Ara wkoll il-paragrafu 50 għal preespożizzjoni alternattiva tad-dud magħżul għall-eliminazzjoni; b'dan l-approċċ, kampjuni ta' dan id-dud preespost fil-jum 0 tal-fażi ta' eliminazzjoni jitqiesu li jipprovdu residwu tal-ġisem realistiku biex bih tinbeda l-kinetika tal-eliminazzjoni.

▼M6

Jekk il-punti tad-dejta plottjati kontra ż-żmien jindikaw tnaqqis esponenzjali kostanti tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-annimali, jista' jintuża mudell b'kompartiment wieħed (ekwazzjoni 4) sabiex jiġi deskritt kif seħħet l-eliminazzjoni maż-żmien.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[ekwazzjoni 3]}$$

Il-proċessi ta' eliminazzjoni kultant jidhru li huma bifażiċi, u juru tnaqqis mgħaġġel ta' C_a matul il-fażijiet bikrin, li jinbidel f'telf iktar kajman tas-sustanzi tat-test fil-fażijiet avvanzati tal-eliminazzjoni (8)(19)(25)). Iż-żewġ fażijiet jistgħu jiġu interpretati bis-suppożizzjoni, li hemm żewġ kompartimenti differenti fl-organiżmu, li minnhom is-sustanza tat-test tintilef b'veloċità differenti. F'dawn il-każijiet, għandu jiġi studjat tagħrif speċifiku (15)(16)(17)(25).

Eliminazzjoni b'żewġ kompartimenti hija deskritta, eż., bl-ekwazzjoni li ġejja (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[ekwazzjoni 4]}$$

A u B jirrappreżentaw id-daqs tal-kompartimenti (f'perċentwal tar-residwu tat-tessut ġenerali), fejn A huwa l-kompartiment b'telf rapidu tas-sustanza, u B huwa l-kompartiment b'telf bil-mod tas-sustanza tat-test. Is-somma ta' A u B tkun 100 % tal-volum tal-kompartimenti tal-annimali sħaħ fi stat kostanti. k_a u k_b jirrappreżentaw il-kostanti ta' eliminazzjoni korrispondenti [d^{-1}]. Jekk il-mudell b'żewġ kompartimenti jitqabbel mad-dejta dwar id-depurazzjoni, il-kostanti tar-rata ta' teħid k_s jista' jiġi stabbilit kif ġej (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[ekwazzjoni 5]}$$

Dawn l-ekwazzjonijiet mudell xorta waħda għandhom jintużaw bil-galbu, speċjalment meta jseħħu bidliet fil-bijodisponibilità tas-sustanza tat-test matul it-test (42).

Bħala alternattiva għall-ekwazzjonijiet mudell deskritti iktar 'il fuq, il-kinetika (k_s u k_e) tista' tiġi kkalkolata wkoll f'sensiela waħda billi jiġi applikat il-mudell tal-kinetika tal-ewwel ordni għad-dejta kollha mill-fażi tat-teħid kif ukoll minn dik ta' eliminazzjoni f'daqqa. Għal deskrizzjoni ta' metodu li jista' jippermetti li jsir kalkolu kombinat bħal dan tal-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni u ta' teħid, jistgħu jiġu kkonsultati r-referenzi (55), (56) u (57).

Ir-Residwi Mhux Eliminati (NER) għandhom jiġu kkalkolati bħala punt ta' tmiem sekondarju billi jiġi moltiplikat il-proporzjon tal-konċentrazzjoni medja fid-dud (C_a) fil-jum 10 tal-fażi ta' eliminazzjoni u l-konċentrazzjoni medja fid-dud (C_a) fi stat kostanti (jum 28 tal-fażi tat-teħid) b'100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \textit{at the end of elimination}(\textit{average}) \times 100}{C_a \textit{ at steady state}(\textit{average})}}$$

▼M6

Appendiċi 3

Eżempju ta' skeda tal-kampjunar għal test tal-bijoakkumulazzjoni ta' 28 jum

a) **Faži tat-teħid (inkluża faži ta' ekwilibrazzjoni ta' 4 ijiem)**

Jum	Attivitajiet
– 6	Tħejjija tas-sospensjoni tal-pit għan-naqal; kondizzjonament tas-sospensjoni għal 48 siegħa;
– 4	Naqal jew frazzjoni tan-naqal miżjudin; taħlit tal-kostitwenti kollha tan-naqal; tneħħija tal-kampjuni tan-naqal ta' naqal ittrattat u dak tal-kontroll bis-solvent sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; mili tal-ilma tal-madwar; inkubazzjoni fil-kundizzjonijiet tat-test (faži ta' ekwilibrazzjoni);
– 3/– 2	Separazzjoni tal-organiżmi tat-test mill-koltura għall-akklimatizzazzjoni;
0	Kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); tneħħija tal-irreplikati għat-teħid ta' kampjuni tal-ilma u n-naqal sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; tqassim għal għarrieda tad-dud fil-kompartimenti tat-test; żamma ta' biżżejjed subkampjuni ta' dud sabiex jiġu stabbiliti l-valuri ta' sfond analitiċi; il-kontroll tal-provvista tal-arja, jekk tintuża sistema ta' test magħluq;
1	Tneħħija tal-irreplikati għall-kampjunar; kontroll tal-provvista tal-arja, l-imġiba tad-dud, il-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 56); teħid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;
2	Kontroll tal-provvista tal-arja, imġiba tad-dud u temperatura;
3	L-istess bħall-jum 1;
4 — 6	L-istess bħall-jum 2;
7	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
8 — 13	L-istess bħall-jum 2;
14	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
15 — 20	L-istess bħall-jum 2;
21	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
22 — 27	L-istess bħall-jum 2;
28	L-istess bħall-jum 1; kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); tmiem tal-faži tat-teħid; żamma ta' biżżejjed subkampjuni ta' dud sabiex jiġu stabbiliti l-valuri ta' sfond analitiċi, il-piż xott u l-piż imxarrab, u l-kontenut lipidu; trasferiment tad-dud mill-irreplikati esposti li jifdal f'reċipjenti li fihom naqal nadif għall-faži ta' eliminazzjoni (ebda żvojtar tal-imsaren); kampjunar tal-ilma, in-naqal u d-dud minn kontrolli bis-solvent; kampjunar tas-soluzzjonijiet ta' nases, jekk ikunu installati.
	L-attivitajiet ta' qabel l-espożizzjoni (faži ta' ekwilibrazzjoni) għandhom jiġu skedati filwaqt li jittieħdu f'kunsiderazzjoni l-karatteristiċi tas-sustanza tat-test. Jekk ikun hemm bżonn, kondizzjonament tan-naqal imħejji fl-ilma tal-madwar f'20 ± 2 °C għal 7 ijiem; f'dan il-każ, tħejjija bikrija tan-naqal!
	L-attivitajiet deskritti għall-jum 2 għandhom isiru kuljum (tal-inqas fil-jiem tax-xogħol).

▼**M6**

b) **Fażi ta' eliminazzjoni**

Jum	Attivitajiet
– 6	Tħejjija tas-sospensjoni tal-pit għan-naqal; kondizzjonament tas-sospensjoni għal 48 siegħa;
– 4	Taħlit tal-kostitwenti kollha tan-naqal; tneħija tal-kampjuni tan-naqal tan-naqal ittrattat u tal-kontroll bis-solvent sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; mili tal-ilma tal-madwar; inkubazzjoni fil-kundizzjonijiet tat-test;
0 (jum 28 tal-fażi tat-teħid)	Kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); trasferiment tad-dud mill-irreplikati esposti li jifdal għar-reċipjenti li fihom naqal nadif; wara **4 — 6 sigħat** tneħħija tal-irreplikati għat-teħid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; tqassim għal għarrieda tad-dud fil-kompartimenti tat-test;
1	Tneħħija tal-irreplikati għall-kampjunar; kontroll tal-provvista tal-arja, l-imġiba tad-dud, il-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); teħid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;
2	Kontroll tal-provvista tal-arja, imġiba tad-dud u temperatura;
3	L-istess bħall-jum 1;
4	L-istess bħall-jum 2;
5	L-istess bħall-jum 1;
6	L-istess bħall-jum 2;
7	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għall-ilma evaporat jekk hemm bżonn;
8 — 9	L-istess bħall-jum 2;
10	L-istess bħall-jum 1; tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni; kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); kampjunar tal-ilma, in-naqal u d-dud mill-kontrolli bis-solvent; kampjunar tas-soluzzjonijiet tan-nases, jekk jiġu installati.
	It-tħejjija tan-naqal qabel tibda l-fażi ta' eliminazzjoni għandha ssir bl-istess mod bħal qabel il-fażi tat-teħid.
	L-attivitajiet deskritti għall-jum 2 għandhom isiru kuljum (tal-inqas fil-jiem tax-xogħol).

▼M6

Appendiċi 4

Ċerti karatteristiċi fiżikokimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli

KOSTITWENTI	KONĊENTRAZZJONIJIET
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2µg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Klorur residwu	< 10 µg/l
Perstiċidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

KOMPOŻIZZJONI TAL-ILMA RIKOSTITWIT RAKKOMANDAT

(a) Soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju

Ħoll 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(b) Soluzzjoni ta' sulfat tal-manjeżju

Ħoll 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(c) Soluzzjoni ta' bikarbonat tas-sodju

Ħoll 2,59 g $NaHCO_3$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(d) Soluzzjoni tal-klorur tal-potassju

Ħoll 0,23 g KCl f'ilma dejonizzat; tella' sa 1 l b'ilma dejonizzat

Is-sustanzi kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

Il-konduttività tal-ilma distillat jew dejonizzat ma għandhiex taqbeż 10 μScm^{-1}.

jitħalltu 25 ml kull wieħed ta' soluzzjonijiet (a) sa (d) u l-volum totali li jiżdied sa 1 l b'ilma dejonizzat. Is-somma tal-joni tal-kalċju u tal-manjeżju f'din is-soluzzjoni hija ta' 2,5 mmol/l.

Il-proporzjon ta' joni Ca:Mg huwa ta' 4:1 u ta' joni Na:K huwa ta' 10:1. Il-kapaċità tal-aċidu $K_{S4.3}$ ta' din is-soluzzjoni hija 0,8 mmol/l.

Żid l-arja mal-ilma dilwit sakemm tintlaħaq is-saturazzjoni tal-ossiġenu, imbagħad aħżnu għal madwar jumejn mingħajr arjazzjoni ulterjuri qabel l-użu.

Il-pH ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli għandha tkun fil-medda ta' 6 — 9.

▼M6

Appendiċi 5

Naqal artifiċjali — rakkomandazzjonijiet dwar it-tħejjija u l-użu

Għall-kuntrarju tar-rekwiżiti fil-metodu ta' ttestjar C.8 (40), huwa rrakkomandat li l-kontenut tal-pit tan-naqal artifiċjali ikun ta' 2 % minflok 10 % tal-piż xott, sabiex ikun jikkorrispondi għal kontenut organiku baxx sa moderat tan-naqal naturali (58).

Il-perċentwal tal-kostitwenti nixfin tan-naqal artifiċjali:

Kostitwent	Karatteristiċi	% ta' naqal imnixxef
Pit	Pit ta' sfanju, grad ta' dekompożizzjoni: "midjum", arja mnixxfa, ma fadal ebda pjanta viżibbli, mitħun fin (daqs tal-partikoli ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Ramel kwarzuż	Daqs tal-gerbub: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-partikoli għandhom ikunu fil-medda ta' 50-200 μm	76
Tafal tal-kawlina	Konteut ta' kawlina ≥ 30 %	22 ± 1
Sors tal-ikel	*Folia urticae*, weraq imfarrak ta' *Urtica sp.* (ħurrieq), mitħun fin (daqs tal-partikoli ≤ 0,5 mm), jew taħlita ta' weraq imfarrak ta' *Urtica sp.* b'alfaċelluloża (1: 1); skont l-istandards tal-farmaċija, għal konsum mill-bniedem; minbarra n-naqal imnixxef	0,4 — 0,5 %
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$, polverizzat, kimikament pur, flimkien man-naqal xott	0,05 — 1
Ilma Dejonizzat	Kondottività ≤ 10 μS/cm, minbarra n-naqal xott	30 — 50

Jekk ikunu mistennijin konċentrazzjonijiet għoljin tal-ammonijaka, eż. jekk is-sustanza tat-test tkun magħrufa li tinibixxi n-nitrifikazzjoni, jista' jkun utli li jiġi sostitwit 50 % tat-trab tal-ħurrieq rikk fin-nitroġenu maċ-ċelluloża (eż., trab α-Ċelluloża, kimikament pura, daqs tal-partikoli ≤ 0,5 mm).

Tħejjija

Il-pit jitnixxef bl-arja u jitfarrak fi trab fin (daqs tal-partikoli ≤ 0,5 mm, ma jifdal ebda pjanta viżibbli). Sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit titħejja bl-użu ta' porzjoni tal-ilma dejonizzat li trid tiddaħħal fin-naqal imnixxef (volum ta' ilma ta' 11,5 × piż xott tal-pit instab li huwa utli biex tiġi prodotta sospensjoni magħquda li tista' titħallat tal-pit (8)) bl-użu ta' apparat omoġenizzanti bi prestazzjoni għolja.

Il-pH ta' din is-sospensjoni huwa aġġustat għal 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni hija kondizzjonata għal tal-inqas jumejn b'tħawwid bil-galbu f'20 ± 2 °C, sabiex tiġi stabbilizzata l-pH u jiġi stabbilit komponent mikrobjali stabbli. Il-pH terġa' titkejjel u tiġi aġġusta għal 6,0 ± 0,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun hemm bżonn. Imbagħad, is-sospensjoni kollha titħallat mal-kostitwenti nixfin l-oħrajn, filwaqt li tittieħed f'kunsiderazzjoni kwalunkwe porzjon għaż-żieda. L-ilma dejonizzat li jifdal jiżdied sabiex jinkiseb naqal omoġenu. Il-pH terġa' titkejjel u tiġi aġġusta għal 6,5 sa 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun hemm bżonn. Madankollu, jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonijaka, jaf ikun utli li l-pH tan-naqal jinżamm inqas minn 7,0 (eż. bejn 6,0 u 6,5). Il-kampuni tan-naqal jittieħdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Jekk ikun mistenni żvilupp tal-ammonijaka, in-naqal artifiċjali jista' jiġi kondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jkunu prevalenti fit-test sussegwenti (eż. proporzjon ta' naqal-ilma 1: 4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test) qabel tiżdied is-sustanza tat-test miegħu, jiġifieri għandu jimtela' bl-ilma, li għandu jingħata l-arja. Fi tmiem il-perjodu ta' kondizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Il-kampjuni tan-naqal jittieħdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku totali (eż. 3 kampjuni).

▼M6

Wara, ir-ramel kwarzuż miżjud jitħallat man-naqal għal kull livell tat-trattament, in-naqal jitqassam fir-reċipjenti tat-test tal-irreplikati, u jimtela bl-ilma tat-test (eż. proporzjon ta' naqal-ilma ta' 1: 4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test). Imbagħad ir-reċipjenti jiġu inkubati fl-istess kundizzjonijiet li jkunu prevalenti fit-test sussegwenti. Dan huwa fejn jibda il-perjodu ta' ekwilibriju. L-ilma tal-madwar għandu jingħata l-arja.

Is-sors tal-ikel magħżul għandu jiddaħħal qabel jew meta s-sustanza tat-test tkun qed tiżdied man-naqal. Għall-ewwel jista' jitħawwad mas-sospensjoni tal-pit (ara iktar 'il fuq). Madankollu, degradazzjoni eċċessiva tas-sors tal-ikel qabel ma jiddaħħlu l-organiżmi tat-test — eż. fil-każ ta' perjodu ta' ekwilibrazzjoni twila — tista' tiġi evitata billi l-perjodu ta' żmien bejn it-tidħil tal-ikel u l-bidu tal-espożizzjoni jinżamm qasir kemm jista' jkun. Sabiex jiġi żgurat li l-ikel ikollu biżżejjed kuntatt mas-sustanza tat-test, is-sors tal-ikel għandu jitħawwad man-naqal mhux iktar tard minn dakinhar li s-sustanza tat-test tiżdied man-naqal. Eċċezzjonijiet jistgħu jkunu meta t-tul tal-perjodu ta' ekwilibrazzjoni jista' jwassal għal degradazzjoni mikrobjali eċċessiva tal-ikel qabel ma jiddaħħlu l-organiżmi tat-test. Il-kampjuni tan-naqal jittieħdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-karbonju organiku totali (eż. 3 kampjuni ta' naqal miżjud jew bil-kontroll).

Il-piż xott tal-komponenti (pit, ramel, kawlina) għandu jiġi rrapportat fi g u f'perċentwal tal-piż xott totali.

Il-volum ta' ilma li għandu jiddaħħal fil-komponenti nixfin matul it-tħejjija tan-naqal għandu jiġi rrapportat f'perċentwal tal-piż xott totali wkoll (eż. 100 % piż xott + 46 % ilma tfisser 1 000 g d.w. jirċievu total ta' 460 ml ilma, li jirriżulta f'1 460 g naqal imxarrab).

Ħżin

Il-kostitwenti nixfin tan-naqal artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post xott u biered f'temperatura ambjentali. In-naqal imħejji u mxarrab jista' jinħażen (għal użu ulterjuri fil-koltura biss) f'4 ± 2 °C fid-dlam għal perjodu ta' bejn ġimgħatejn u ebra' ġimgħat minn dakinhar tat-tħejjija (8).

In-naqal miżjud bis-sustanza tat-test għandu jintuża mill-ewwel sakemm ma jkunx hemm informazzjoni li tindika li n-naqal partikolari jista' jinħażen mingħajr ma jkunu affettwati t-tossiċità u l-bijodisponibilità tas-sustanza tat-test. Il-kampjuni tan-naqal miżjud jistgħu jinħażnu fil-kundizzjonijiet irrakkomandati għas-sustanza tat-test partikolari analizzata.

▼M6

Appendiċi 6

Speċijiet ta' oligoċaeti rakkomandati għall-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni

***Tubifex tubifex* (MÜLLER),Tubifiċidi, Oligoċaeta**

L-oligoċaeti tublifiċidi (Tubifiċidi, Oligoċaeti) *Tubifex tubifex* (Müller) jgħixu fin-naqal tal-ilma ħelu f'tubi li fihom linja mukus. F'dawn it-tubi, id-dud jgħix rasu 'l isfel, u jinġesti partikoli tan-naqal billi juża l-mikroorganiżmi assoċjati u fdalijiet organiċi. Il-porzjon ta' wara normalment jidħol fl-ilma tal-madwar għal skopijiet ta' teħid tan-nifs. Għad li din l-ispeċi tgħix f'medda wiesgħa ta' tipi ta' naqal madwar l-emisfera tat-Tramuntana kollha, *Tubifex tubifex* tippreferi daqsijiet tal-ħbub relattivament fini (59). L-idoneità ta' din l-ispeċi għall-ittestjar ekotossikoloġiku hija deskritta pereżempju fi (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Metodi tal-koltura

Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' *Tubifex tubifex* sabiex isiru testijiet tal-bijoakkumulazzjoni, id-dud irid jinżamm f'koltura tal-laboratorju permanenti. Sistema li tikkonsisti f'naqal artifiċjali fuq il-bażi tal-ħamrija artifiċjali skont il-Metodu ta' Ttestjar C.8 (4) u ilma rikostitwit skont il-metodu ta' ttestjar C.1 hija rrakkomandata għall-koltura ta' *T. tubifex* (8).

Kontenituri tal-ħġieġ jew l-azzar inossidabbli b'għoli ta' 12 sa 20 cm jistgħu jintużaw bħala reċipjenti tal-koltura. Kull kontenitur tal-koltura jimtela b'saff naqal artifiċjali mxarrab kif deskritt fl-Appendiċi 5. Il-fond tas-saff tan-naqal għandu jippermetti sabiex id-dud iġib ruħu b'mod naturali meta jħaffer (tal-inqas 2 cm fond għal *T. tubifex*). L-ilma rikostitwit jiddaħħal fis-sistema. Għandha tingħata attenzjoni sabiex in-naqal ma jiġix disturbat kemm jista' jkun. Il-korp tal-ilma jingħata ftit arja (eż. 2 bżieżaq fis-sekonda b'arja ffiltrata b'0,45 μm) permezz ta' pipetta pasteur imqiegħda 2 cm 'il fuq mill-wiċċ tan-naqal. It-temperatura rrakkomandata tal-koltura hija ta' 20 ± 2 °C.

Id-dud jiddaħħal fis-sistema tal-koltura b'tagħbija massima ta' 20 000 individwu/m^2 superfiċje tan-naqal. Tagħbija ikbar tista' tikkaġuna tnaqqis fir-rati ta' tkabbir u riproduzzjoni (43).

F'kolturi tan-naqal artifiċjali, id-dud irid jintema'. Dieta li tikkonsisti f'ikel tal-ħut mitħun fin, eż. TetraMin® tista' sservi bħala nutrizzjoni addizzjonali (8); Klerks 1994, komunikazzjoni personali. Ir-rati tat-tmigħ għandhom jippermettu tkabbir u riproduzzjoni suffiċjenti u għandhom iżommu l-akkumulazzjoni ta' ammonijaka u tkabbir fungali fil-koltura baxxi kemm jista' jkun. L-ikel jista' jingħata darbtejn fil-ġimgħa (eż. 0,6 — 0,8 mg kull cm^2 superfiċje tan-naqal). L-esperjenza prattika għallmet li l-applikazzjoni ta' ikel sospiż u omoġenizzat filma dejonizzat tista' tħaffef id-distribuzzjoni omoġena tal-ikel fil-wiċċ tan-naqal fil-kontenituri tal-koltura.

Biex tiġi evitata l-akkumulazzjoni tal-ammonijaka, l-ilma tal-madwar għandu jinbidel bl-użu ta' sistema bi fluss kontinwu, jew, tal-inqas darba fil-ġimgħa, b'mod manwali. In-naqal għandu jinbidel kull tliet xhur fil-kolturi tal-istokk.

Il-kampjunar tad-dud mill-koltura jista' jsir billi n-naqal tal-koltura jingħadda minn passatur ta' 1 mm jekk huma meħtieġa biss l-adulti. Għaż-żamma tal-fosdqiet tal-larva, xieraq li tintuża xibka ta' 0,5 mm, u għad-dud żgħir passatur ta' 0,25 mm. Il-passaturi jistgħu jitqiegħdu f'ilma rikostitwit wara li jkun ingħadda n-naqal minn ġo fih. Id-dud iħalli x-xibka u mbagħad jista' jinġabar mill-ilma bl-użu ta' forċipi tal-azzar ħafif jew pipetta bi truf illostrati bil-fjamma.

▼M6

Jintużaw biss kampjuni ta' *Tubifex tubifex* intatti u identifikati biċ-ċar (eż. (64)) sabiex jinbdew test jew kolturi ġodda. Dud marid jew korrut kif ukoll fosdqi tal-larva infestati b'ifa fungali jridu jintremew.

Koltura sinkronizzata tista' tipprovdi dud ta' età speċifika f'intervalli xierqa meta jkun hemm bżonn. Reċipjenti ġodda tal-koltura jiġu stabbiliti fl-intervalli magħżulin (eż. kull ġimgħatejn), u l-ewwel jibdew annimali ta' ċerta età (eż. fosdqa tal-larva). Fil-kundizzjonijiet tal-koltura deskritti hawnhekk, id-dud isir adult wara 8 — 10 ġimgat. Il-kolturi jistgħu jiġabru meta d-dud ikun bied fosdqi ġodda, eż. wara għaxart ijiem. L-adulti fil-kampjun jistgħu jintużaw għat-testijiet, u jistgħu jinbdew kolturi ġodda bil-fosdqi tal-larva.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbrikulida, Oligoċaeti**

Anki *lumbriculus variegatus* (Lumbrikulidi, Oligoċaeti) tgħix f'naqal tal-ilma ħelu madwar id-dinja u tintuża ħafna f'ittestjar ekotossikoloġiku. Informazzjoni dwar il-bijoloġija, il-kundizzjonijiet tal-koltura, u s-sensittività tal-ispeċijiet tista' tinkiseb minn (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* tista' tiġi kolturata wkoll fin-naqal artifiċjali rrakkomandat għal *T. tubifex* skont (8) fi ħdan ċerti limitazzjonijiet. Peress li, fin-natura tagħha, *L. variegatus* tippreferi naqal iktar aħrax minn *T. tubifex (59)*, il-kolturi tal-laboratorju bin-naqal artifiċjali użati għal *T. tubifex* jistgħu jieqfu wara 4 sa 6 xhur. L-esperjenza prattika wriet li *L. variegatus* tista' tinżamm f'substratum ramli (eż. ramel kwarzuż, żrar fin) f'sistema bi fluss kontinwu bl-użu ta' ikel tal-ħut bħala sors nutrizzjonali tul bosta snin bla tiġdid tas-substratum. Vantaġġ kbir ta' *L. variegatus* meta mqabbla ma' speċijiet oligoċaeti akkwatiċi huwa r-riproduzzjoni veloċi tagħha, li tirriżulta f'bijomassa li tiżdied malajr ħafna f'popolazzjonijiet kolturati fil-laboratorju (1)(6)(9)(10).

Metodi tal-koltura

Il-kundizzjonijiet tal-koltura għal *Lumbriculus variegatus* huma spjegati f'dettall f'Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Hawn taħt jingħata sommarju qasir ta' dawn il-kundizzjonijiet.

Id-dud jista' jiġi kolturat f'akkwarji kbar (57 — 80 l) fi 23 °C b'fotoperjodu ta' 16L:8D (100 — 1 000 lux) bl-użu ta' ilma naturali mġedded kuljum (45 — 50 l għal kull akkwarju). Is-substrat jitħejja bi qtugħ ta' karti kannella mhux ibbliċjati fi strixxi, li mbagħad jistgħu jitħalltu mal-ilma tal-koltura għal ftit sekondi biex jirriżultaw f'biċċiet żgħar ta' substrat tal-karta. Imbagħad dan is-substrat jista' jintuża fl-akkwarji tal-koltura ta' *Lumbriculus* billi jgħatti ż-żona tal-qiegħ tat-tank, jew inkella jinħażen iffriżat f'ilma dejonizzat sabiex jintuża iktar tard. Ġeneralment, substrat ġdid fit-tank idum madwar xahrejn.

Kull koltura tad-dud tinbeda b'500 — 1 000 dudu, u tintema' sospensjoni ta' 10 ml li fiha 6 g ikel tal-bidu għat-troti 3 darbiet fil-ġimgħa f'kundizzjonijiet ta' tiġdid jew bi fluss kontinwu. Kolturi statiċi jew semistatiċi għandhom jirċievu rati inqas ta' tmigħ biex jiġi evitat it-tkabbir batterjali u fungali. Is-substrat tal-karta u l-ikel għandu jiġi analizzat għas-sustanzi li għandhom jintużaw fit-testijiet tal-bijoakkumulazzjoni.

F'dawn il-kundizzjonijiet, in-numru ta' individwi fil-koltura ġeneralment jirdoppja f'madwar 10 sa 14-il jum.

Lumbriculus variegatus tista' titneħħa mill-kolturi eż. billi s-substrat jiġi ttrasferit f'xibka b'malja fina, jew organiżmi li jużaw pipetta tal-ħġieġ b'toqba wiesgħa llostrata bil-fjamma (dijametru ta' madwar 5 mm), f'bekk separat. Jekk is-substrat jiġi kotrasferit f'dan il-bekk, il-bekk li fih id-dud u s-substrat jitħalla f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu lejl sħiħ, u dan ser ineħħi s-substrat mill-bekk, filwaqt

▼M6

li d-dud jibqa' fil-qiegħ tar-reċipjent. Imbagħad jista' jiddaħħal f'tankijiet tal-koltura mħejjin ġodda, jew ikompli jiġi pproċessat għat-test kif spjegat f'(1) u (6). Korrimenti jew awtotomija fid-dud għandhom jiġu evitati, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illostrati bil-fjamma, jew maqbad tal-azzar inossidabbli għat-tqandil ta' dan id-dud.

Problema li trid titqies b'mod kritiku meta tintuża *L. variegatus* f'testijiet tal-bijoakkumulazzjoni tan-naqal hija l-modalità ta' riproduzzjoni tagħha (arkitomija segiwta mill-morfallassi). Din ir-riproduzzjoni asesswali tirriżulta f'żewġ frammenti, li ma jiklux għal ċertu perjodu sakemm tiġi riġenerata l-parti tar-ras jew tad-denb (eż. (36)(37)). Dan ifisser li f'*L. variegatus* it-teħid ta' naqal u inkwinanti bl-inġestjoni jaf ma jseħħx kontinwament bħal f'tubifiċidi, li ma jirriproduċux bi frammentazzjoni.

Għalhekk, għandha ssir sinkronizzazzjoni biex jiġu minimizzati r-riproduzzjoni u r-riġenerazzjoni bla kontroll, u l-varjazzjoni kbira sussegwenti fir-riżultati tat-test. It-tali varjazzjoni tista' sseħħ, meta ċerti individwi, li jkunu fframmentaw u għaldaqstant ma jiklux għal ċertu perjodu ta' żmien, ikunu esposti inqas għassustanza tat-test meta mqabbla ma' individwi oħrajn, li ma jifframmentawx matul it-test, eż. (38). 10 sa 14-il jum qabel ma tibda l-espożizzjoni, id-dud għandu jiġi frammentat b'mod artifiċjali (sinkronizzazzjoni) (65). Għandu jintuża dud kbir, li idealment ma għandux ikollu marki ta' frammentazzjoni riċenti. Dan id-dud jista' jitqiegħed fuq slide tal-ħġieġ f'qatra ilma tal-koltura, u jiġi dissezzjonat fir-reġjun medjan tal-ġisem b'sikkina kirurġika. Għandha tingħata attenzjoni li t-truf ta' wara jkunu ta' daqs simili. It-truf ta' wara mbagħad għandhom jitħallew jirriġeneraw irjus ġodda f'reċipjent tal-kultura li fih l-istess sottostrat kif użat fil-kultura u l-ilma rikostitwit sal-bidu tal-espożizzjoni. Ir-riġenerazzjoni ta' rjus ġodda hija indikata meta d-dud sinkronizzat ikun qiegħed iħaffer fis-sottostrat (il-preżenza ta' rjus riġenerati tista' tiġi kkonfermata bl-ispezzjoni ta' sottokampjun rappreżentattiv taħt mikroskopju binokulari). Wara, l-organiżmi tat-test ikunu mistennija li jkunu fi stat fiżjoloġiku simili. Dan ifisser li meta r-riġenerazzjoni bil-morfallassi sseħħ f'dud sinkronizzat matul it-test, prattikament l-annimali kollha jkunu mistennija jkunu esposti bl-istess mod għan-naqal miżjud. It-tmigħ tad-dud sinkronizzat għandu jsir malli d-dud jibda jħaffer fis-substrat, jew 7 ijiem wara d-dissezzjoni. L-iskema tat-tmigħ għandha tkun paragunabbli mal-kolturi regolari, iżda jista' jkun rakkomandat li d-dud sinkronizzat jintema mal-istess sors tal-ikel bħal kif jintuża fit-test. Id-dud għandu jinżamm f'temperatura tat-test, f'20 ± 2 °C. Wara r-riġenerazzjoni, għat-test għandu jintuża dud sħiħ intatt ta' daqs simili li jkun qiegħed jgħum jew jitkaxkar b'mod attiv fuq stimolu mekkaniku ħafif. Korrimenti jew awtotomija fid-dud għandhom jiġu evitati, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illostrati bil-fjama, jew maqbad tal-azzar inossidabbli għat-tqandil ta' dan id-dud.

Meta tintuża *Lumbriculus variegatus* fit-test, minħabba l-modalità ta' riproduzzjoni speċifika ta' din l-ispeċi, għandha sseħħ żieda fin-numru ta' dud matul it-test jekk il-kundizzjonijiet ikunu xierqa (6). Għandu jiġi rreġistrat nuqqas ta' riproduzzjoni f'test tal-bijoakkumulazzjoni b'*L. variegatus*, u dan irid jiġi kkunsidrat meta jiġu interpretati r-riżultati tat-test.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubifiċidi, Oligoċaeti (mhux ivvalidati fir-ringtest)**

Branchiura sowerbyi tgħix f'firxa ta' tipi ta' naqal ta' riżervi, lagi, għadajjar u xmajjar, u oriġinarjament f'żoni tropikali. Tista' tinstab ukoll f'korpi tal-ilma sħin fl-emisfera tat-Tramuntana. Madankollu, hija iktar abbundanti f'naqal tafli u bittajn b'kontenut għoli ta' materja organika. Barra minn hekk, id-dud jgħix fis-saff

▼**M6**

tan-naqal. Anki l-parti ta' wara tad-dud normalment tkun fil-ħofor. Din l-ispeċi malajr tingħaraf minħabba l-filamenti tal-garġi fuq in-naħa ta' wara tagħha. L-adulti jistgħu jilħqu tul ta' 9 -11-il cm u piż imxarrab ta' 40-50 mg. Id-dud għandu rata għolja ta' riproduzzjoni, juri żminijiet ta' rdoppjar ta' popolazzjoni ta' inqas minn ġimgħatejn u fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u t-tmigħ deskritti hawn taħt (ASton et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* ntużat kemm fi studji tat-tossiċità kif ukoll dawk tal-bijoakkumulazzjoni (Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair et al. 1996, (67) rispettivament).

Metodi tal-koltura

Hawn taħt jingħata sommarju tal-kundizzjonijiet tal-koltura għal *Branchiura sowerbyi* (ipprovdut minn Mercedes R. Marchese, INALI, l-Arġentina, u Carla J. Roghair, RIVM, Il-Pajjiżi l-Baxxi).

Ma hemm bżonn ta' ebda teknika unika għall-koltura tal-organiżmi tat-test. L-organiżmi jistgħu jiġu kolturati bl-użu ta' naqal naturali u mhux kontaminat (31). L-esperjenza prattika għallmet li midjum li jikkonsisti f'naqal naturali u ramel itejjeb il-kundizzjoni tad-dud meta mqabbel ma' naqal naturali pur (32)(67). Għall-koltura jistgħu jintużaw bekkijiet ta' 3 L li fihom 1 500 ml midjum ta' naqal/ilma, u li jikkonsistu f'375 ml naqal naturali mhux kontaminat (madwar 10 % tal-Karbonju Organiku totali; madwar 17 % tal-partikoli ≤ 63 μm), 375 ml ramel nadif (M32), u 750 ml ilma tal-vit rikostitwit jew deklorinat (31)(32)(67). Jistgħu jintużaw ukoll karti bħala substrat għall-koltura, iżda t-tkabbir tal-popolazzjoni jkun inqas milli f'naqal naturali. F'sistemi semistatiċi s-saff tal-ilma fil-bekk jingħata ftit arja, u l-ilma tal-madwar għandu jiġġedded darba fil-ġimgħa.

Kull bekk ikun fih 25 dudu żgħir għall-ewwel. Wara xahrejn, id-dud il-kbir jittieħed min-naqal bil-pinzetta u jitqiegħed f'bekk ġdid b'midjum ta' naqal/ilma magħmul ġdid. Il-bekk il-qadim fih fosdqi u dud żgħir ukoll. B'dan il-mod jistgħu jinġabru sa 400 dudu żgħir għal kull bekk. Id-dud adult jista' jintuża għar-riproduzzjoni għal tal-inqas sena.

Il-kolturi għandhom jinżammu f'temperatura ta' 21 sa 25 °C. Il-varjazzjoni tat-temperatura għandha tinżamm għal inqas minn ± 2 °C. Iż-żmien meħtieġ għall-iżvilupp embrijoniku minn meta bajda titbied sakemm iż-żgħar iħallu l-fosdqa huwa ta' madwar tliet ġimgħat f'25 °C. Instab li l-produzzjoni tal-bajd miksuba għal kull dudu li jibqa' ħaj f'*B. sowerbyi* kienet tvarja bejn 6,36 (31) u 11,2 (30) fit-tajn f'25 °C. In-numru ta' bajd għal kull fosdqa varja bejn 1,8 u 2,8 (66)(69) jew anki wasal sa 8 (68).

L-ossiġenu dissolt, l-ebusija tal-ilma, it-tempratura, u l-pH għandhom jitkejlu darba fil-ġimgħa. L-ikel tal-ħut (eż. TetraMin®) jista' jiddaħħal bħala sospensjoni darbtejn jew tliet darbiet fil-ġimgħa ad libitum. Id-dud jista' jintema wkoll ħass li jitħalla joqgħod *ad libitum.*

Vantaġġ kbir ta' din l-ispeċi huwa l-bijomassa individwali għolja (sa 40 — 50 mg piż imxarrab għal kull individwu). Għalhekk, din l-ispeċi tista' tintuża għall-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi tat-test mhux radjutikkettati. Tista' tiġi esposta fis-sistemi użati għal *T. tubifex* jew *L. variegatus* b'individwu wieħed għal kull irreplikat (11). Madankollu, imbagħad għandha tiżdied ir-replikazzjoni, sakemm ma jintużawx kompartimenti tat-test ikbar (11). Barra minn hekk, il-kriterju tal-validità marbut mal-imġiba tat-tħaffir irid jiġi aġġustat għal din l-ispeċi.

▼**M6**

LETTERATURA

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Il-Kummissjoni Ewropea (KE) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Uffiċċju tal-Pubblikazzjonijiet tal-Unjoni Ewropea tal-Komunitajiet Ewropej, il-Lussemburgu.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness, Test tal-Bijokonċentrazzjoni tal-Ħut bi Fluss Kontinwu.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, Test tat-tossiċità tal-Kironomidi tal-ilma-naqal bl-użu ta' naqal miżjud

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼**M6**

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Il-kapitoli li ġejjin ta' dan l-Anness:

Il-Kapitolu A.4, pressjoni tal-fwar

Il-Kapitolu A.5, Tensjoni tas-superfiċje

Il-Kapitolu A.6, Solubilità fl-ilma

Il-Kapitolu A.8, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu tal-flask mheżżeż

Il-Kapitolu A.24, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu HPLC

Il-Kapitolu C.7, degradazzjoni — degradazzjoni abijotika: idroliżi bħala funzjoni tal-pH

Il-Kapitolu C.4 A-F Determinazzjoni tal-bijodegradabilità lesta

Il-Kapitolu C.19, Stima tal-koeffiċjent ta' assorbiment (K_{oc}) fuq il-ħamrija u fuq il-ħama tad-drenaġġ bl-użu ta' kromatografija bi prestazzjoni għolja tal-likwidu (HPLC)

Il-Kapitolu C.29, CO_2 tal-bijodegradabilità lesta f'reċipjenti ssiġillati

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼**M6**

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼**M6**

(40) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Tossiċità għall-Ħanex.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991) Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼M6

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. TEST TAT-TOSSIĊITÀ FI STADJU BIKRI TAL-ĦAJJA TAL-ĦUT

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 210 tal-OECD (2013). It-testijiet fl-istadji bikrija tal-ħajja tal-ħut huma maħsuba biex jiddefinixxu l-effetti letali u subletali tas-sustanzi kimiċi fuq l-istadji u l-ispeċijiet ittestjati. Huma jrendu informazzjoni ta' valur għall-istima tal-effetti letali u subletali kroniċi tas-sustanza kimika fuq speċijiet ta' ħut oħrajn.

2. Il-linja gwida tat-test 210 hija bbażata fuq proposta mir-Renju Unit li ġiet diskussa f'laqgħa ta' esperti tal-OECD li saret f'Medmenham (ir-Renju Unit) f'Novembru 1988 u li kompliet tiġi aġġornata fl-2013 sabiex tkun tirrifletti l-esperjenza fl-użu tat-test u r-rakkomandazzjonijiet minn sessjoni ta' ħidma tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità tal-ħut, li ġiet organizzata f'Settembru 2010 (1).

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

3. L-istadji bikrija tal-ħajja tal-ħut huma esposti għal firxa ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test maħlula fl-ilma. Huma ppreferuti kundizzjonijiet bi fluss kontinwu; madankollu, jekk dawn ma jkunux possibbli, huma aċċettabbli wkoll kundizzjonijiet semistatiċi. Għad-dettalji, għandu jiġi kkonsultat id-dokument ta' gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċili (2). It-test jinbeda billi l-bajd fertilizzat jitqiegħed f'kompartimenti tat-test u jitkompla għal perjodu ta' żmien speċifiku għall-ispeċi li huwa neċessarju sabiex il-ħut taħt kontroll jilħaq stadju bikri tal-ħajja. L-effetti letali u subletali jiġu vvalutati u mqabbla mal-valuri tal-kontroll sabiex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) jew (i) il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) u/jew (ii) l-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{20}) permezz ta' mudell ta' rigressjoni sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża bidla ta' x % fl-effett imkejjel. Ir-rappurtar tal-konċentrazzjonijiet tal-effett u l-parametri rilevanti jista' jiddependi fuq il-qafas regolatorju. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom jibbrakitjaw l-EC_x biex b'hekk l-EC_x toħroġ mill-interpolazzjoni aktar milli mill-estrapolazzjoni (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

4. Is-sustanza kimika tat-test tirreferi għal dak li qed jiġi ttestjat. Għandhom ikunu magħrufa s-solubbiltà fl-ilma (ara l-kapitolu A.6 ta' dan l-Anness) u l-pressjoni tal-fwar (ara l-kapitolu A.4 ta' dan l-Anness) tas-sustanza kimika tat-test u għandu jkun disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fis-soluzzjonijiet tat-test bi preċiżjoni u limitu ta' kwantifikazzjoni magħrufa u rrappurtati. Għalkemm mhuwiex neċessarju li jsir it-test, ir-riżultati minn test tat-tossiċità akuta (ara l-kapitoli C.1 jew C.49 ta' dan l-Anness), preferibbilment imwettaq bl-ispeċijiet magħżula għal dan it-test, jistgħu jipprovdu informazzjoni siewja.

5. Jekk il-metodu ta' ttestjar jintuża għall-ittestjar ta' taħlita, il-kompożizzjoni tagħha għandha tiġi kkaratterizzata kemm jista' jkun possibbli, pereżempju, mill-identità kimika tal-kostitwenti tagħha, l-okkorrenza kwantitattiva tagħhom u l-proprjetajiet speċifiċi għas-sustanzi tagħhom (bħal dawk imsemmija fuq). Qabel jintuża l-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar regolatorju ta' taħlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk dan huwiex ser jipprovdi riżultati aċċettabbli għall-iskop regolatorju maħsub.

6. L-informazzjoni siewja tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza, is-solubbiltà fl-ilma, l-istabilità fl-ilma u fid-dawl, il-pK_a, il-P_{ow} u r-riżultati ta' test għall-bijodegradabilità immedjata (pereżempju, il-kapitoli C.4 jew C.29 ta' dan l-Anness).

▼M7

IL-VALIDITÀ TAT-TEST

7. Sabiex test ikun validu japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun > 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja matul it-test;

— it-temperatura tal-ilma ma għandhiex tvarja b'aktar minn ± 1,5 °C bejn il-kompartimenti tat-test jew bejn il-jiem suċċessivi fi kwalunkwe ħin matul it-test u għandha tinżamm fi ħdan il-meded tat-temperaturi speċifikati għall-ispeċi tat-test (Appendiċi 2);

— Il-kejl analitiku tal-konċentrazzjonijiet tat-test huwa obbligatorju.

— is-sopravivenza ġenerali tal-bajd fertilizzat u s-suċċess fil-kontrolli wara t-tifqis u, fejn rilevanti, fil-kontrolli tas-solventi, għandhom ikunu akbar minn jew daqs il-limiti definiti fl-Appendiċi 2.

8. Jekk tiġi osservata devjazzjoni żgħira mill-kriterji tal-validità, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tad-dejta tat-test u dawn il-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapport. L-effetti fuq is-sopravivenza, it-tifqis jew it-tkabbir li jseħħu fil-kontroll tas-solvent, meta mqabbel mal-kontroll negattiv, għandhom jiġu rrapportati u diskussi fil-kuntest tal-affidabbiltà tad-dejta tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Kompartimenti tat-test

9. Jistgħu jintużaw reċipjenti tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli jew ta' kwalunkwe materjal kimikament inerti ieħor. Billi s-silikon huwa magħruf bħala li għandu kapaċità qawwija li jassorbi sustanzi lipofiliċi, l-użu ta' tubi tas-silikon fi studji bi fluss kontinwu u l-użu ta' siġilli tas-silikon f'kuntatt mal-ilma għandhom jitnaqqsu bl-użu ta', pereżempju, akkwarji ta' ħġieġ magħmul minn blokka waħda. Id-dimensjonijiet tar-reċipjenti għandhom ikunu kbar biżżejjed sabiex jippermettu tkabbir xieraq fil-kontroll, iż-żamma tal-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt (pereżempju, għall-ispeċijiet ta' ħut żgħir, din tista' tinkiseb b'tank b'volum ta' 7 litri) u l-konformità mal-kriterji tar-rata tat-tagħbija msemmija fil-paragrafu 19. Idealment, il-kompartimenti tat-test jitqiegħdu f'pożizzjoni għal għarrieda fiż-żona tat-test. Disinn bi blokki aleatorji b'kull trattament preżenti f'kull blokka huwa ppreferut minn disinn kompletament aleatorju. Il-kompartimenti tat-test għandhom ikunu protetti minn disturbanza mhux mixtieqa. Preferibbilment, is-sistema tat-test għandha tiġi kkondizzjonata bil-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għal tul ta' żmien suffiċjenti sabiex ikunu jistgħu jintwerew konċentrazzjonijiet ta' esponiment stabbli qabel l-introduzzjoni tal-organiżmi tat-test.

Għażla ta' speċijiet

10. L-ispeċijiet ta' ħut irrakkomandati huma mogħtija fit-Tabella 1. Dan ma jeskludix l-użu ta' speċijiet oħrajn, iżda jista' jkun li l-proċedura tat-test ikollha tiġi adatta sabiex tipprovdi kundizzjonijiet tat-test addattati. F'dan il-każ, ir-raġuni li tiġġustifika l-għażla tal-ispeċi u l-metodu sperimentali għandhom ikunu magħrufa.

Iż-żamma tal-ħut riproduttiv

11. Id-dettalji dwar iż-żamma tal-istokk riproduttiv taħt kundizzjonijiet sodisfaċenti jistgħu jinstabu fl-Appendiċi 3 u fir-referenzi ċċitati (3)(4)(5).

It-trattament tal-bajd iffertilizzat, tal-embrijuni u tal-larvi

12. Fil-bidu, il-bajd iffertilizzat, l-embrijuni u l-larvi jistgħu jiġu esposti f'reċipjenti iżgħar tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli fi ħdan ir-reċipjent ewlieni, mgħammrin bi xbieki fil-ġenb jew fit-truf biex ikun hemm fluss tas-soluzzjoni tat-test mir-reċipjent. Fluss kontinwu mhux turbolenti f'dawn ir-reċipjenti żgħar

▼M7

jista' jiġi indott billi jiġu sospiżi minn fergħa mqiegħda biex ir-reċipjent jiċċaqlaq 'il fuq u 'l isfel, iżda l-organiżmi għandhom dejjem jinżammu mgħaddsin. Il-bajd iffertilizzat ta' ħut salmonidu jista' jiġi sistemat fuq xkafef jew xbieki b'feṫiet kbar biżżejjed li jippermettu lil-larvi jgħaddu minnhom wara li jfaqqsu.

13. Meta jkunu intużaw kontenituri tal-bajd, grilji jew xbieki biex il-bajd jinżamm fir-reċipjent ewlieni tat-test, dawn ir-restrizzjonijiet għandhom jitneħħew wara li jfaqqsu l-larvi, skont il-gwida pprovduta fl-Appendiċi 3, ħlief li x-xbieki għandhom jinżammu biex jiġi evitat li l-larva taħrab. Jekk ikun hemm bżonn li jiġu ttrasferiti l-larvi, dawn ma għandhomx ikunu esposti għall-arja u ma għandhomx jintużaw xbieki biex il-larvi jinħelsu mill-kontenituri tal-bajd. It-twaqqit ta' dan it-trasferiment ivarja skont l-ispeċijiet u għandu jiġi ddokumentat fir-rapport. Madankollu, mhux dejjem ikun neċessarju li jsir trasferiment.

Ilma

14. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwati fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test (ara l-Appendiċi 4). Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Sabiex jiġi żgurat li l-lima tad-dilwizzjoni mhuwiex ser ikollu influwenza żejda fuq ir-riżultat tat-test (pereżempju b'kumplessazzjoni tas-sustanza kimika tat-test) jew jaffettwa b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk riproduttiv, għandhom jittieħdu kampjuni f'intervalli għal analiżi. Għandu jsir il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), l-ammonja, il-pestiċidi klorini residwi totali, il-karbonju organiku totali u s-solidi sospiżi, pereżempju, fuq bażi biennali meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li huwa relattivament kostanti fil-kwalità. Jekk l-ilma jkun magħruf li huwa ta' kwalità varjabbli, il-kejl għandu jsir aktar ta' spiss; il-frekwenza tiddependi fuq kemm il-kwalità tkun varjabbli. Fl-Appendiċi 4 jissemmew xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma tad-dilwizzjoni aċċettabbli.

Is-soluzzjonijiet tat-test

15. Għat-testijiet bi fluss kontinwu, hija meħtieġa sistema li tiddistribwixxi u tiddilwixxi b'mod kontinwu soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (pereżempju, pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) sabiex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-ilma tad-dilwizzjoni għandhom jiġu kkontrollati f'ċerti intervalli matul it-test u ma għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Instab li rata tal-fluss ekwivalenti għal mill-inqas ħames volumi tal-kompartimenti tat-test kull 24 siegħa hija xierqa (3). Madankollu, jekk ir-rata tat-tagħbija speċifikata fil-paragrafu 19 tiġi rrispettata, rata ta' fluss aktar baxxa ta', pereżempju, 2-3 volumi tal-kompartimenti tat-test tkun possibbli sabiex jiġi evitat li l-ikel jitneħħa malajr.

16. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jiġu preparati billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Preferibbilment, is-soluzzjoni ewlenija għandha titħejja sempliċiment billi s-sustanza kimika tat-test titħallat jew tiġi aġitata f'ilma tad-dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. tħawwid u/jew ultrasonikazzjoni). Jistgħu jintużaw kolonni ta' saturazzjoni (kolonni tas-solubilità) jew metodi ta' dożaġġ passiv (6) sabiex tinkiseb soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. L-użu ta' portatur ta' solvent mhuwiex rakkomandat. Madankollu, f'każ li jkun hemm bżonn ta' solvent, fl-istess ħin għandu jsir kontroll tas-solvent, fl-istess konċentrazzjoni tas-solvent bħat-trattamenti kimiċi; i.e. preferibbilment, il-livell tas-solvent għandu

▼M7

jkun ugwali fil-konċentrazzjonijiet kollha, kif ukoll fil-kontroll tas-solvent. Għal xi sistemi ta' dilwituri, dan jista' jkun teknikament diffiċili; hawnhekk, il-konċentrazzjoni tas-solvent fil-kontroll tas-solvent għandha tkun daqs l-ogħla konċentrazzjoni tas-solvent fil-grupp tat-trattament. Għal sustanzi li diffiċili jiġu ttestjati, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru. 23 dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċili (2). Jekk jintuża solvent, l-għażla tas-solvent tiġi ddeterminata mill-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru. 23 jirrakkomanda konċentrazzjoni massima ta' 100 µl/l. Sabiex jiġi evitat l-effett potenzjali tas-solvent fuq il-punti tat-tmiem imkejla (7), huwa rakkomandat li l-konċentrazzjoni tas-solvent tinżamm kemm jista' jkun baxxa possibbli.

17. Għal test semistatiku, jistgħu jiġu segwiti żewġ proċeduri ta' tiġdid differenti. Kwalunkwe waħda mis-soluzzjonijiet ġodda tat-test jitħejjew f'kompartimenti nodfa u l-bajd u l-larvi li jibqgħu ħajjin jiġu ttrasferiti bil-galbu f'kompartimenti ġodda, jew l-organiżmi tat-test jinżammu fil-kompartimenti tat-test, filwaqt li jinbidel proporzjon (mill-inqas żewġ terzi) tas-soluzzjoni tat-test / tal-volum tal-kontroll.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tal-Esponiment

Durata

18. It-test għandu jibda mill-aktar fis possibbli wara li l-bajd ikun iffertilizza u preferibbilment wara li jkun ġie mgħaddas fis-soluzzjonijiet tat-test qabel jibda t-tifriq tal-blastodisc, jew kemm jista' jkun qrib wara dan l-istadju. Id-durata tat-test ser tiddependi fuq l-ispeċijiet użati. Xi durati rakkomandati huma mogħtija fl-Appendiċi 2.

Tagħbija

19. In-numru ta' bajd fertilizzat fil-bidu tat-test għandu jkun biżżejjed sabiex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti tal-istatistika. Huma għandhom jiġu distribwiti b'mod aleatorju fost it-trattamenti u għandhom jintużaw mill-inqas 80 bajda, li jinqasmu b'mod ugwali bejn mill-inqas erba' kompartimenti tat-test irreplikati. Ir-rata tat-tagħbija (il-bijomassa skont il-volum tas-soluzzjoni tat-test) għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex tkun tista' tinżamm konċentrazzjoni maħlula ta' ossiġenu ta' mill-inqas 60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja mingħajr ossiġenazzjoni matul l-istadju tal-bajda u tal-larva. Għat-testijiet bi fluss kontinwu, ġiet rakkomandata rata ta' tagħbija b'piż imxarrab ta' mhux aktar minn 0.5 g/l kull 24 siegħa u mhux inqas minn 5 g/l ta' soluzzjoni fi kwalunkwe ħin (3).

Id-dawl u t-temperatura

20. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu adattati għall-ispeċi tat-test (ara Appendiċi 2).

Tmigħ

21. L-ikel u t-tmigħ huma kritiċi u huwa essenzjali li jiġi fornut l-ikel korrett għal kull stadju tal-ħajja minn żmien xieraq u f'livell suffiċjenti sabiex jiġi sostnut it-tkabbir normali. It-tmigħ għandu jkun bejn wieħed u ieħor ugwali fost ir-repliki, sakemm ma jiġix aġġustat biex jieħu kont tal-mortalità. Għandhom jitneħħew l-ikel u r-rawt żejda, skont kif ikun hemm bżonn, sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni ta' skart. Ir-reġimi tat-tmigħ dettaljati huma mogħtija fl-Appendiċi 3 iżda, bl-esperjenza li qiegħda tinkiseb, ir-reġimi tal-ikel u tat-tmigħ qegħdin jiġu raffinati kontinwament sabiex tittejjeb is-sopravivenza u jiġi ottimizzat it-tkabbir. L-ikel ħaj jipprovdi sors ta' arrikkiment ambjentali u, għalhekk, għandu jintuża minflok jew flimkien mal-ikel imnixxef jew iffriżat, kull meta jkun xieraq għall-ispeċijiet u għall-istadju tal-ħajja.

Il-konċentrazzjonijiet tat-test

22. Normalment ikunu meħtieġa ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, b'minimu ta' erba' repliki kull konċentrazzjoni, spazjati b'fattur kostanti ta' mhux aktar minn 3.2. Jekk tkun disponibbli, għandha tiġi kkunsidrata l-informazzjoni dwar l-ittestjar akut, preferibbilment bl-istess speċi

▼M7

u/jew test tas-sejbien tal-medda (1) meta tintgħażel il-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test. Madankollu, għandhom jiġu kkunsidrati s-sorsi ta' informazzjoni kollha meta tintgħażel il-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, inklużi sorsi bħal, pereżempju, "read-across" dejta dwar l-ittestjar tat-tossiċità akuta tal-embrijuni tal-ħut. Test tal-limitu, jew test tal-limitu estiż, b'inqas minn ħames konċentrazzjonijiet bħala t-test definittiv, jista' jkun aċċettabbli meta jkunu jridu jiġu stabbiliti biss l-NOECs empiriċi. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test ta' aktar minn 96 siegħa LC_{50} jew 10 mg/l, skont liema tkun l-aktar baxxa, ma hemmx bżonn li jiġu ttestjati.

Kontrolli

23. Għandu jsir kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u, jekk ikun meħtieġ, kontroll tas-solvent li jkun fih it-trasportatur tas-solvent biss, minbarra s-serje tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 16).

Il-Frekwenza tal-Kejl u d-Determinazzjonijiet Analitiċi

24. Qabel il-bidu tal-perjodu ta' esponiment, għandha tiġi żgurata l-funzjoni xierqa tas-sistema tal-kunsinna tas-sustanza kimika fost ir-repliki kollha (pereżempju, billi jitkejlu l-konċentrazzjonijiet tat-test). Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi meħtieġa, inkluż limitu xieraq ta' kwantifikazzjoni (LOQ) u għarfien suffiċjenti dwar l-istabilità tas-sustanza fis-sistema tal-ittestjar. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu ddeterminati f'intervalli regolari sabiex jiġi kkaratterizzat l-esponiment. Huwa meħtieġ minimu ta' ħames determinazzjonijiet. Fis-sistemi bi fluss kontinwu, il-kejl analitiku tas-sustanza kimika tat-test f'replikat wieħed għal kull konċentrazzjoni għandu jsir mill-inqas darba fil-ġimgħa u jinbidel sistematikament fost ir-repliki. Id-determinazzjonijiet analitiċi addizzjonali ta' spiss itejbu l-kwalità tal-eżitu tat-test. Jista' jkun meħtieġ li l-kampjuni jiġu ffiltrati sabiex titneħħa kwalunkwe materja partikulata (eż. bl-użu ta' daqs ta' 0.45 μm tal-pori) jew inkella jiġu ċċentrifugati sabiex jiġi żgurat li d-determinazzjonijiet fuq is-sustanza kimika jsiru f'soluzzjoni vera. Sabiex jitnaqqas l-adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test, il-filtri għandhom jiġu ssaturati qabel jintużaw. Meta l-konċentrazzjonijiet imkejla ma jibqgħux fil-medda ta' 80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom jiġu ddeterminati u espressi b'mod relattiv għall-konċentrazzjoni medja aritmetika għat-testijiet bi fluss kontinwu (ara l-Appendiċi 6 tal-metodu tal-ittestjar C.20 għall-kalkolazzjoni tal-medja aritmetika (8)) u jiġu espressi b'mod relattiv għall-medja ġeometrika tal-konċentrazzjonijiet imkejla għat-testijiet semistatiċi (ara l-Kapitolu 5 fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli (2)).

25. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, il-pH u t-temperatura għandhom jitkejlu fir-reċipjenti kollha tat-test, mill-inqas kull ġimgħa, filwaqt li s-salinità u l-ebusija, jekk ikunu ġustifikati, għandhom jitkejlu fil-bidu u fi tmiem it-test. Idealment, it-temperatura għandha tiġi ssorveljata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wieħed tat-test.

Osservazzjonijiet

26. **Stadju tal-iżvilupp embrijoniku**: l-istadju embrijoniku fil-bidu tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test għandu jiġi vverifikat bl-aktar mod preċiż possibbli. Dan jista' jsir bl-użu ta' kampjun rappreżentattiv ta' bajd ippreservat u mnaddaf kif xieraq.

27. **Tifqis u sopravivenza**: l-osservazzjonijiet fuq it-tifqis u s-sopravivenza għandhom isiru mill-inqas darba kuljum u n-numri jridu jiġu rreġistrati. Jekk jiġi osservat fungu fuq il-bajd fi stadju bikri tal-iżvilupp tal-embrijun (eż. fl-ewwel jew fit-tieni jum tat-test), dak il-bajd għandu jingħadd u jitneħħa. Embrijuni, larva u ħut żgħir mejtin għandhom jitneħħew malli jiġu osservati minħabba li jistgħu jitmermru malajr u jistgħu jitfarrku minħabba l-azzjonijiet tal-ħut l-ieħor. Għandha tingħata attenzjoni estrema meta jitneħħew individwi mejtin sabiex ma ssirx ħsara fiżika lill-bajd/larva li jmissu magħhom. Is-sinjali ta' mewt ivarjaw skont l-ispeċi u l-istadju tal-ħajja. Pereżempju:

▼M7

— għall-bajd fertilizzat: partikolarment fl-istadji bikrija, nuqqas notevoli ta' traslučiditá u bidla fil-kulur, kawża ta' koagulazzjoni u/jew preċipitazzjoni ta' proteini, li twassal għal dehra bajda opaka;

— għall-embrijuni, għal-larva u għall-ħut żgħir: immobilità u/jew nuqqas ta' moviment respiratorju u/jew nuqqas ta' taħbit tal-qalb u/jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimulu mekkaniku.

28. **Dehra anormali**: in-numru ta' larva jew ħut żgħir li juru anormalità fil-forma tal-ġisem għandu jiġi rreġistrat f'intervalli adegwati skont id-durata tat-test u n-natura tal-anormalità deskritta. Ta' min jinnota larva u ħut żgħir anormali jseħħu b'mod naturali u jistgħu jkunu fl-ordni ta' perċentwal kbir fil-kontroll(i) f'xi speċijiet. Meta d-deformitajiet u l-imġiba anormali assoċjata jitqiesu li huma tant severi li jkun hemm tbatija konsiderevoli għall-organiżmu u dan ikun laħaq punt fejn ma jkunx jista' jirkupra, huwa jista' jitneħħa mit-test. Dawn l-annimali għandhom jiġu ewtanizzati u ttrattati bħala mortalitajiet għal analiżi tad-dejta sussegwenti. L-iżvilupp normali tal-embrijuni kien iddokumentat għall-maġġoranza tal-ispeċijiet irrakkomandati f'dan il-metodu ta' ttestjar (9) (10) (11) (12).

29. **Imġiba anormali**: l-anormalitajiet, pereżempju, iperventilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, trankwillità atipika u mġiba atipika tat-tmigħ għandhom jiġu rreġistrati f'intervalli adegwati skont id-durata tat-test (pereżempju darba kuljum għal speċijiet li jgħixu f'ilma sħun). Dawn l-effetti, għalkemm diffiċli jiġu kkwantifikati, jistgħu, meta jiġu osservati, jgħinu fl-interpretazzjoni tad-dejta dwar il-mortalità.

30. **Piż**: fi tmiem it-test, il-ħut kollu li jibqa' ħaj jintiżen mill-inqas fuq bażi replikata (permezz tar-rappurtar tal-għadd ta' annimali fir-replikat u tal-piż medju għal kull annimal): il-piż imxarrab — (imnixxef bit-taptip) huwa ppreferut, madankollu, tista' tiġi rrapportata wkoll dejta dwar il-piż xott (13).

31. **Tul**: fi tmiem it-test, jitkejlu t-tulijiet individwali. It-tul totali huwa rrakkomandat, madankollu, jekk il-ġewnaħ tad-denb jitħassar jew jitħaffer, jista' jintuża it-tul standard. L-istess metodu għandu jintuża għall-ħut kollu f'test partikolari. It-tul individwali jista' jitkejjel permezz ta', pereżempju, kalipers, kamera diġitali jew mikrometru okulari kkalibrat. It-tulijiet minimi tipiċi huma definiti fl-Appendiċi 2.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

32. Huwa rrakkomandat li d-disinn tal-esperiment u l-għażla tat-test statistiku jippermettu qawwa adegwata (80 % jew ogħla) sabiex jiġu identifikati l-bidliet ta' importanza bijoloġika fil-punti tat-tmiem fejn għandha tiġi rrapportata NOEC. Ir-rappurtar tal-konċentrazzjonijiet tal-effett u l-parametri rilevanti jista' jiddependi fuq il-qafas regolatorju. Jekk irid jiġi rrapportat EC_x, id-disinn tal-esperiment u l-għażla tal-mudell ta' rigressjoni għandhom jippermettu li ssir stima tal-EC_x sabiex b'hekk (i) l-intervall ta' fiduċja ta' 95 % irrapportat għal EC_x ma jkunx fih żero u ma jkunx wiesa' żżejjed, (ii) l-intervall ta' fiduċja ta' 95 % għall-medja mbassra f'EC_x ma jkunx fih il-medja tal-kontroll u (iii) ma jkun hemm ebda nuqqas ta' adattament sinifikanti tal-mudell ta' rigressjoni għad-dejta. Kwalunkwe wieħed mill-approċċi jirrikjedi l-identifikazzjoni tal-bidla perċentwali f'kull punt ta' tmiem li huwa importanti li jiġi identifikat jew stmat. Id-disinn sperimentali għandha jitfassal biex jippermetti dan. Meta l-kundizzjonijiet għad-determinazzjoni tal-EC_x ma

▼M7

jiġux issodisfati, għandu jintuża l-approċċ ta' NOEC. Mhuwiex probabbli li l-istess bidla perċentwali tapplika għall-punti tat-tmiem kollha, lanqas ma huwa probabbli li jkun jista' jiġi ddisinjat esperiment fattibbli li jissodisfa dawn il-kriterji għall-punti tat-tmiem kollha, għalhekk huwa importanti li wieħed jiffoka fuq il-punti tat-tmiem, li huma importanti għall-esperiment rispettiv sabiex l-esperiment jiġi ddisinjat kif xieraq. Il-flow diagrams ta' statistika u l-gwida għal kull approċċ huma disponibbli fl-Appendiċijiet 5 u 6 sabiex iservu ta' gwida fit-trattament tad-dejta u fl-għażla tal-aktar test ta' statistika jew mudell xieraq li għandu jintuża. Jistgħu jintużaw approċċi ta' statistika oħrajn, diment li jkunu xjentifikament ġustifikati.

33. Ser ikun neċessarju li l-varjazzjonijiet jiġu analizzati f'kull sett ta' repliki bl-użu ta' analiżi tal-varjanza jew proċeduri b'tabella ta' kontinġenza u li jintużaw il-metodi ta' analiżi statistika xierqa abbażi ta' din l-analiżi. Sabiex ikunu jistgħu jsiru paraguni multipli bejn ir-riżultati fil-konċentrazzjonijiet individwali u dawk għall-kontrolli, huwa rrakkomandat li jsir it-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra jew ta' Williams għal risponsi kontinwi u test ta' tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage għal risponsi kwantali li huma konsistenti ma' rispons ta' konċentrazzjoni monotona u mingħajr ebda evidenza ta' varjanza extra-binomjali (14). Meta jkun hemm evidenza ta' varjanza extra-binomjali, hija rrakkomandata modifika ta' Rao-Scott tat-test ta' Cochran-Armitage (15) (16) jew jiġi applikat it-test ta' Williams jew Dunnett (wara trasformazzjoni arcsin-square-root) jew ta' Jonckheere-Terpstra għall-proporzjonijiet irreplikati. Meta d-dejta ma tkunx konsistenti ma' rispons ta' konċentrazzjoni monotona, il-metodu ta' Dunnett jew Dunn jew dak ta' Mann-Whitney jista' jinstab li huwa utli għal risponsi kontinwi, filwaqt li t-test Eżatt ta' Fisher jista' jinstab li huwa utli għal risponsi kwantali (14) (17) (18). Għandha tingħata attenzjoni meta jiġi applikat kwalunkwe metodu jew mudell ta' statistika sabiex ikun żgurat li r-rekwiżiti tal-metodu jew tal-mudell jiġu ssodisfati (eż. il-varjabbiltà minn kompartiment minn ieħor hija stmata u kkunsidrata fid-disinn sperimentali u fit-test jew fil-mudell użat). Id-dejta għandha tiġi evalwata għan-normalità u l-Appendiċi 5 jindika x'għandu jsir fuq ir-residwi minn ANOVA. L-Appendiċi 6 jiddiskuti kunsiderazzjonijiet addizzjonali għall-approċċ ta' rigressjoni. Għandhom jiġu kkunsidrati t-trasformazzjonijiet sabiex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti ta' test tal-istatistika. Madankollu, it-trasformazzjonijiet li jippermettu t-tqabbil ta' mudell ta' rigressjoni jeħtieġu attenzjoni kbira, minħabba li, pereżempju, bidla ta' 25 % fir-reazzjoni mhux ittrasformata ma tikkorrespondix għal bidla ta' 25 % f'rispons ittrasformat. Fl-analiżijiet kollha, il-kompartiment tat-test, mhux il-ħut individwali, huwa l-unità tal-analiżi u l-unità sperimentali u kemm it-testijiet tal-ipoteżi kif ukoll ir-rigressjoni għandhom jirriflettu dan (3) (14) (19) (20).

Rapport tat-test

34. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

Sustanza monokostitwenti

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika, bħall-IUPAC jew l-isem CAS, in-numru CAS, SMILES jew il-kodiċi InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità tas-sustanza kimika tal-impuritajiet, kif xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (Inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk ikun xieraq.

Sustanza multi-kostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati kemm jista' jkun possibbli, eż., mill-identità tas-sustanza kimika (ara fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti

Speċijiet tat-test:

— l-isem xjentifiku, ir-razza, is-sors u l-metodu tal-ġbir tal-bajd iffertilizzat u t-trattament sussegwenti.

▼M7

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-proċedura tat-test użata (pereżempju, semistatika jew bi fluss kontinwu, tagħbija);

— fotoperjodu/i;

— id-disinn tat-test (pereżempju, l-għadd ta' kompartimenti tat-test u repliki, l-għadd ta' bajd għal kull replika, il-materjal u d-daqs tal-kompartiment tat-test (l-għoli, il-wisa', il-volum), il-volum tal-ilma għall-kompartiment tat-test);

— il-metodu ta' tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-frekwenza tat-tiġdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);

— il-metodu li jintuża għad-dożaġġ tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompi, sistemi ta' dilwizzjoni)

— l-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu li permezz tiegħu nkisbu u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;

— il-karatteristiċi tal-ilma tad-dilwizzjoni: pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli tal-klorin residwu (jekk jitkejjel), il-karbonju organiku totali (jekk jitkejjel), is-solidi sospiżi (jekk jitkejlu), is-salinità tal-medium tat-test (jekk titkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir;

— il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;

— informazzjoni dettaljati dwar it-tmigħ (pereżempju, it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza).

Riżultati rrapportati individwalment (jew fuq bażi rreplikata) u bħala medja u koeffiċjent tal-varjazzjoni, kif xieraq, għall-punti tat-tmiem li ġejjin:

— evidenza li l-kontrolli ssodisfaw l-istandard ta' aċċettabbiltà tas-sopravivenza globali tal-ispeċi għat-test (Appendiċi 2);

— dejta dwar il-mortalità f'kull stadju (embrijun, larva u żgħir) u l-mortalità kumulattiva;

— jiem għat-tifqis, numru ta' larva li faqqsu kull jum u t-tmiem tat-tifqis;

— in-numru ta' ħut f'saħħtu fi tmiem it-test;

— dejta għat-tul (speċifika l-istandard jew l-ammont totali) u l-piż tal-annimali li jibqgħu ħajjin;

— l-inċidenza, id-deskrizzjoni u n-numru ta' anormalitajiet morfoloġiċi, jekk hemm;

— l-inċidenza, id-deskrizzjoni u n-numru ta' effetti ta' mġiba, jekk hemm;

— l-approċċ għall-analiżi statistika (analiżi ta' rigressjoni jew analiżi tal-varjanza) u t-trattament tad-dejta (it-test statistiku jew il-mudell użat);

— il-konċentrazzjoni bla effett osservat għal kull rispons ivvalutat (NOEC);

▼M7

— il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (p = 1,05) għal kull rispons ivvalutat (LOEC);

— EC_x għal kull rispons ivvalutat, jekk applikabbli, u l-intervalli ta' kunfidenza (eż. 90 % jew 95 %) u graff tal-mudell imqabbel għall-kalkolazzjoni tagħha, l-inklinazzjoni tal-kurva tar-rispons ta' konċentrazzjoni, il-formula tal-mudell ta' rigressjoni, il-parametri stmati tal-mudell u l-iżbalji standard tagħhom.

Kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu tal-ittestjar.

Diskussjoni tar-riżultati, inkluża kwalunkwe influwenza tad-devjazzjonijiet mill-metodu ta' ttestjar fuq l-eżitu tat-test.

Tabella 1

Speċi ta' ħut rakkomandat għat-test

ILMA ĦELU	ILMA SALMURA U BAĦAR
Oncorhynchus mykiss Trota qawsalla	*Cyprinodon variegatus* Karpjun tas-snien varjegati
Pimephales promelas Karpjun buras	*Menidia* sp. Menidja
Danio rerio Żebra	
Oryzias latipes Medaka	

TAGĦRIF

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Il-Kapitolu 20 ta' dan l-Anness, *Daphnia magna* Reproduction Test.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 — 376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

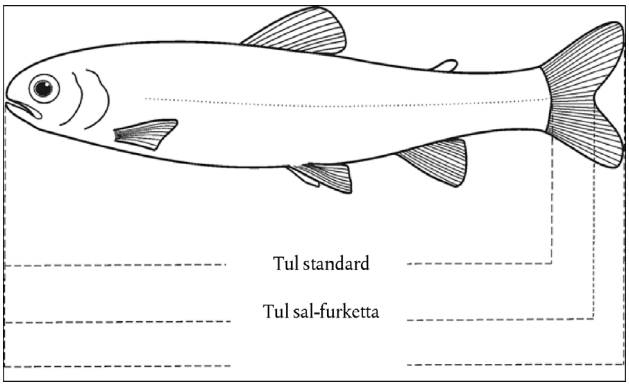
Tul sal-furketta (fork length - FL): jirreferi għat-tul mill-ponta tal-geddum sat-tarf tax-xewk tal-pinen f'nofs id-denb u jintuża f'ħut fejn huwa diffiċli li wieħed jgħid fejn tispiċċa l-kolonna vertebrali (www.fishbase.org)

Tul standard (standard length - SL): jirreferi għat-tul ta' ħuta mkejjel mill-ponta tal-geddum sat-tarf ta' wara tal-aħħar vertebra jew sat-tarf ta' wara tal-porzjon midlaterali tal-hypural plate. Fi kliem sempliċi, dan il-kejl jeskludi t-tul tad-denb. (www.fishbase.org)

Tul totali (total length - TL): jirreferi għat-tul mill-ponta tal-geddum sal-ponta tal-lobu itwal tad-denb, ġeneralment imkejjel bil-lobi kkumpressati tul il-linja tan-nofs. Dan huwa kejl ta' linja dritta, li ma jitkejjilx fuq il-kurva tal-ġisem (www.fishbase.org)

Figura 1

Deskrizzjoni tat-tulijiet differenti użati



Sustanza kimika: sustanza jew taħlita

EC_x: (Konċentrazzjoni effettiva għal effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organiżmi tat-test f'perjodu ta' esponiment partikolari meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' esponiment definit.

Konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test li fiha tiġi osservata s-sustanza kimika sabiex ikollha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test 'il fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett ta' ħsara daqs jew akbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni xħiħa għal kif intgħażlet l-LOEC (u b'ħekk l-NOEC). L-appendiċijiet 5 u 6 jipprovdu gwida.

Konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC, li meta mqabbla mal-kontroll, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$), f'perjodu ta' esponiment ddikjarat.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu tal-ittestjar

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti ta' reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

▼M7

Appendiċi 2

IL-KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST, ID-DURATA U L-KRITERJI TAS-SOPRAVIVENZA GĦALL-ISPEĊIJIET IRRAKKOMANDATI

SPEĊIJIET	IL-KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST			IRRAKKOMANDATI DURATA TAT-TEST	It-tul totali medju minimu tipiku tal-ħut tal-kontroll fi tmiem l-istudju (mm) (1)	IS-SOPRAVIVENZA TAL-KONTROLLI (minima)	
	It-temperatura (°C)	Salinità ($^0/_{00}$)	Fotoperjodu (sigħat)			Is-suċċess tat-tifqis	Is-suċċess wara t-tifqis
Ilma Helu:							
Oncorhynchus mykiss Trota qawsalla	10 ± 1,5 (2)		12 - 16 (3)	ġimagħtejn wara li l-kontrolli jibdew jieklu weħidhom (jew 60 jum wara t-tifqis)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Karpjun buras	25 ± 1,5		16	32 jum mill-bidu tat-test (jew 28 jum wara t-tifqis)	18	70 %	75 %
Danio rerio Żebra	26 ± 1,5		12 - 16 (4)	30 jum wara t-tifqis	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Medaka	25 ± 2		12 - 16 (4)	30 jum wara t-tifqis	17	80 %	80 %
Tal-Estwarju u tal-Baħar:							
Cyprinodon variegatus Karpjun tas-snien varjegati	25 ± 1,5	15-35 (5)	12 - 16 (4)	32 jum mill-bidu tat-test (jew 28 jum wara t-tifqis)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Menidja	22 - 25	15-35 (5)	13	28 jum	20	80 %	60 %

Spjega:

(1) It-tul totali medju minimu tipiku mhuwiex kriterju ta' validità, iżda d-devjazzjonijiet taħt iċ-ċifra indikata għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa b'rabta mas-sensittività tat-test. It-tul totali medju minimu huwa mnissel minn għażla ta' dejta disponibbli fil-ħin attwali.

(2) Ir-razza partikolari tat-trota qawsalla ttestjata tista' tirrikjedi l-użu ta' temperaturi oħrajn. L-istokk riproduttiv għandu jinżamm fl-istess temperatura bħal dik li tintuża għall-bajd. Wara li jasal il-bajd mingħand nissiel kummerċjali, jeħtieġ li jsir adattament qasir (pereżempju ta' siegħa jew sagħtejn) sabiex tiġi ttestjata t-temperatura wara l-wasla.

(3) Dlam għal-larva sa ġimgħa wara t-tifqis, ħlief meta tkun qed tiġi spezzjonata, imbagħad dawl baxx matul it-test (fotoperjodu ta' bejn 12 u 16-il siegħa) (4).

(4) Għal kwalunkwe kundizzjonijiet tat-test partikolari, ir-reġim tad-dawl għandu jkun kostanti.

(5) Għal kwalunkwe test partikolari, dan għandu jsir għal ± $2^0/_{00}$.

02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 2447

▼M7

Appendiċi 3

GWIDA DWAR IT-TMIGĦ U T-TRATTAMENT GĦAR-RIPRODUZZJONI U L-ITTESTJAR TA' ANNIMALI TAL-ISPEĊIJIET IRRAKKOMANDATI

SPEĊIJIET	IKEL (*)				IL-ĦIN TAT-TRASFERIMENT WARA T-TIFQIS	IL-ĦIN SAL-EWWEL TMIGĦ
	Ħut riproduttiv	Larva li għadha tfaqqas	Żgħar			
			Tip	Frekwenza		
Ilma Ħelu:						
Oncorhynchus mykiss Trota qawsalla	ikel tat-trota	Xejn ([a])	ikel tal-bidu tat-trota BSN	2-4 porzjonijiet ta' għalf kuljum	14-16-il jum wara t-tifqis jew fl-għawma (mhux essenzjali)	19-il jum wara t-tifqis jew fl-għawma
Pimephales promelas Karpjun buras	BSN, ikel imsaffaf, FBS	BSN	BSN48, ikel imsaffaf	2-3 darbiet kuljum	ladarba t-tifqis ikun 90 %	jumejn wara t-tifqis
Danio rerio Żebra	BSN, ikel imsaffaf,	Ikel tal-larva kummerċjali, protożoa ([b]), proteina ([c])	BSN48, ikel imsaffaf	BSN darba kuljum; Ikel imsaffaf darbtejn kuljum	ladarba t-tifqis ikun 90 %	jumejn wara t-tifqis
Oryzias latipes Medaka	ikel imsaffaf	BSN, ikel imsaffaf (jew protożoa jew rotiferi)	BSN48, ikel imsaffaf (jew rotiferi)	BSN darba kuljum; ikel imsaffaf darbtejn kuljum jew ikel imsaffaf u rotiferi darba kuljum	mhux applikabbli	6-7 ijiem wara l-bidien
Tal-Estwarju u tal-Baħar:						
Cyprinodon varieqatus Karpjun tas-snien varjegati	BSN, ikel imsaffaf, FBS	BSN	BSN48	2-3 porzjonijiet ta' għalf kuljum	mhux applikabbli	jum wara t-tifqis/l-għawma
Menidia sp. Menidja	BSN48, ikel imsaffaf	BSN	BSN48	2-3 porzjonijiet ta' għalf kuljum	mhux applikabbli	jum wara t-tifqis/l-għawma

Spjega:

(*) L-ikel għandu jingħata sakemm il-ħut jixba'. Għandhom jitneħħew ikel u rawt żejda, skont kif ikun hemm bżonn, sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni ta' skart
FBS gambli tal-ilma mielaħ iffriżati; adulti Artemja sp
BSN gambli nauplii tal-ilma mielaħ; għadhom kif faqqsu
BSN48 gambli nauplii tal-ilma mielaħ; f'età ta' 48 siegħa
([a]) il-larva mill-membrana tal-isfar tal-bajd ma għandhiex bżonn ikel
([b]) iffiltrati minn kultura mħallta
([c]) bċejjeċ żgħar minn proċess ta' fermentazzjoni

02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 2448

▼M7

Appendiċi 4

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI

Komponent	Konċentrazzjoni limitu
Materja partikolata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonja mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromju	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Ħadid	1 µg/l
Ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

▼M7

Appendiċi 5

GWIDA STATISTIKA GĦAD-DETERMINAZZJONI TAL-NOEC

Ġenerali

It-tank irreplikat huwa l-unità tal-analiżi. B'hekk, għall-kejl kontinwu, bħad-daqs, għandhom jiġu kkalkolati l-medji tal-irreplikati jew il-medjani tal-irreplikati u dawn il-valuri tal-irreplikati huma d-dejta għall-analiżi. Għandha tintwera l-qawwa tat-testijiet użati, preferibbilment abbażi ta' database storika adegwata għal kull laboratorju. L-effett tad-daqs li jista' jiġi identifikat b'qawwa ta' 75-80 % għandu jiġi pprovdut għal kull punt tat-tmiem bit-test statistiku li jrid jintuża.

Id-databases disponibbli fiż-żmien tal-iżvilupp ta' dan il-metodu ta' ttestjar jistabbilixxu l-qawwa possibbli skont il-proċeduri statistiċi rrakkomandati. Laboratorju individwali għandu juri l-abbiltà tiegħu li jissodisfa dan ir-rekwiżit tal-qawwa billi jwettaq l-analiżi tal-qawwa tiegħu stess jew billi juri li l-Koeffiċjent tal-Varjazzjoni (CV) għal kull rispons ma jaqbiżx id-90 perċentil tas-CVs użati fl-iżvilupp tat-TG. It-Tabella 1 tipprovdi dawn is-CVs. Jekk ikunu disponibbli biss il-medji tal-irreplikati jew il-medjani tal-irreplikati, mela allura s-CV irreplikat jista' jiġi injorat.

Tabella 1

Id-90 Perċentil tas-CVs għall-Ispeċijiet tal-Ilma Ħelu magħżula

Speċijiet	Rispons	CV_Bejn ir-Repliki	CV_Fi ħdan ir-Repliki
Trota Qawsalla	Tul	17,4	9,8
	Piż	10,1	28
Karpjun Buras	Tul	16,9	13,5
	Piż	11,7	38,7
Żebra	Tul	43,7	11,7
	Piż	11,9	32,8

Kważi għat-testijiet statistiċi kollha użati għall-evalwazzjoni tal-istudji tossikoloġiċi fil-laboratorji, il-paraguni ta' interess għandhom jiġu kkontrollati mill-gruppi ta' trattament. Għal dik ir-raġuni, mhuwiex xieraq li jintalab li jsir test F sinifikanti ta' ANOVA qabel l-użu tat-test ta' Dunnett jew ta' Williams jew test sinifikanti ta' Kruskal-Wallis qabel l-użu tat-test ta' Jonckheere-Terpstra, Mann-Whitney jew Dunn (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

It-test ta' Dunnett għandu aġġustament ta' multipliċità inkorporat u r-rati pożittivi foloz u negattivi foloz tiegħu huma affettwati b'mod avvers bl-użu tat-test F bħala għassies. B'mod simili, it-testijiet b'tendenza rigressiva ta' Williams u Jonckheere-Terpstra li jużaw livell ta' sinifikat ta 0.05 f'kull pass jippreservaw rata pożittiva falza globali ta' 5 % u r-rata u l-qawwa tat-testijiet jiġu affettwati b'mod avvers bl-użu tat-test F- jew Kruskal-Wallis bħala kustodju. It-testijiet ta' Mann-Whitney u ta' Dunn għandhom jiġu aġġustati għall-multipliċità u huwa rrakkomandat l-aġġustament ta' Bonferroni-Holm.

Diskussjoni fil-fond rigward il-maġġoranza tar-rakkomandazzjonijiet dwar l-ittestjar tal-ipoteżi u l-verifika tas-suppożizzjonijiet sottostanti għal dawn it-testijiet hija mogħtija fl-OECD (2006), li tinkludi wkoll bibljografija estensiva.

▼M7

It-trattament tal-Kontrolli meta Jintuża Solvent

Jekk jintuża solvent, għandhom jiġu inklużi kemm kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni kif ukoll kontroll tas-solvent. Iż-żewġ kontrolli għandhom jitqabblu għal kull rispons u jiġu kkombinati għal analiżi statistika jekk ma tinstab ebda differenza sinifikanti bejn il-kontrolli. Altrimenti, għandu jintuża l-kontroll tas-solventi għad-determinazzjoni tal-NOEC jew għall-istima tal-EC_x u ma jintużax il-kontroll tal-ilma. Ara r-restrizzjoni fil-kriterji tal-validità (Paragrafu 7).

Għat-tul, il-piż, il-proporzjon ta' tifqis tal-bajd jew mortalità tal-larva jew larva anormali, u għall-ewwel jew l-aħħar jum tat-tifqis jew tal-għawma, għandu jintuża T-test jew it-test ta' Mann-Whitney sabiex il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni jitqabbel mal-kontroll tas-solvent f'livell ta' sinifikat ta' 0.05, billi jiġu injorati l-gruppi tat-trattamenti kollha. Ir-riżultati ta' dawn it-testijiet għandhom jiġu rrapportati.

Il-kejl tad-daqs (it-tul u l-piż)

Il-valuri tat-tul u tal-piż tal-ħut individwali jistgħu jiġu distribwiti b'mod normali jew log-normali. Fi kwalunkwe każ, il-valuri medji rreplikati għandhom it-tendenza li jkunu distribwiti b'mod normali permezz tas-Central Limit Theorem u kkonfermati mid-dejta minn aktar minn 100 studju tal-ELS ta' tliet speċijiet li jgħixu fl-ilma ħelu. Inkella, meta d-dejta jew id-databases storiċi jissuġġerixxu distribuzzjoni b'log-normali għall-valuri ta' daqsijiet ta' ħut individwali, jista' jiġi kkalkolat il-logaritmu medju rreplikat tal-valuri tal-ħut individwali u d-dejta għall-analiżi tista' mbagħad tkun l-anti-logs ta' dawn il-logaritmi medji rreplikati.

Id-dejta għandha tiġi evalwata għall-konsistenza b'distribuzzjoni normali u omoġeneità tal-varjanza. Għal dan il-għan, għandhom jintużaw ir-residwi minn mudell ANOVA b'konċentrazzjoni bħall-varjabbli tal-klassi ta' spjegazzjoni waħda. Tista' tintuża determinazzjoni viżiva minn plotts ta' diffużjoni u istogrammi jew minn stem-and-leaf plots. B'mod alternattiv, jista' jintuża test formali bħal Shapiro-Wilk jew Anderson-Darling. Il-konsistenza mal-omoġeneità tal-varjanza tista' tiġi vvalutata minn eżaminazzjoni viżiva tal-istess plott ta' diffużjoni jew b'mod formali permezz tat-test ta' Levene. Huma biss it-testijiet parametriċi (eż. ta' Williams, Dunnett) li jeħtieġ li jiġu evalwati għan-normalità jew għall-omoġeneità tal-varjanza.

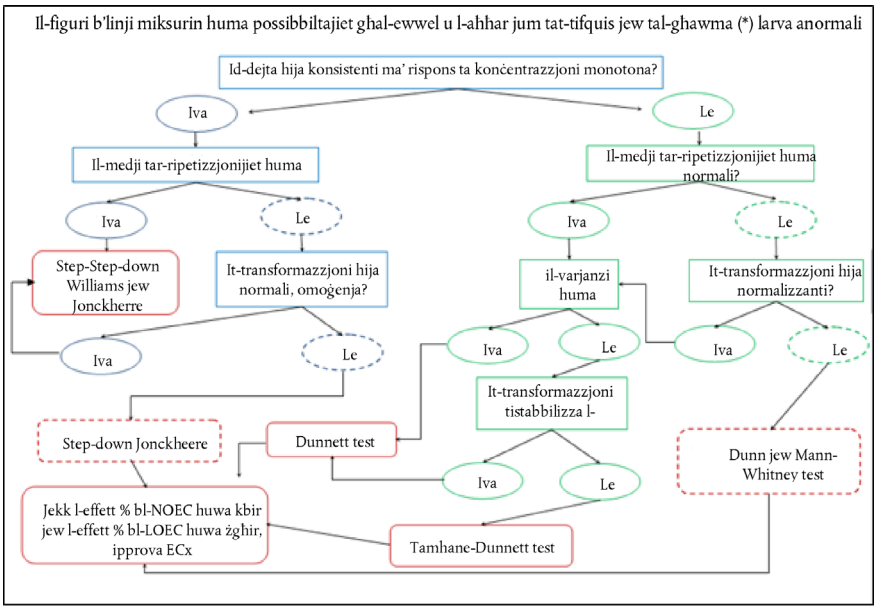
Għandha tingħata attenzjoni lill-outliers possibbli u lill-effett tagħhom fuq l-analiżi. Jistgħu jintużaw it-test tal-outlier ta' Tukey u l-ispezzjoni viżiva tal-istess plottijiet ta' residwi deskritti hawn fuq. Għandu jiġi mfakkar li l-osservazzjonijiet huma repliki sħaħ, għalhekk, it-tħollija barra ta' outlier mill-analiżi għandha ssir biss wara kunsiderazzjoni bir-reqqa.

It-testijiet statistiċi li jagħmlu użu mill-karatteristiċi tad-disinn sperimentali u l-aspettattiva bijoloġika huma testijiet b'tendenza rigressiva, bħal Williams u Jonckheere-Terpstra. Dawn it-testijiet jassumu rispons ta' konċentrazzjoni monotona u d-dejta għandha tiġi vvalutata għall-konsistenza ma' dik is-suppożizzjoni. Dan jista' jsir b'mod viżiv minn plott ta' diffużjoni tal-medji rreplikati fl-isfond tal-konċentrazzjoni tat-test. Ikun utli jekk dak il-plott ta' diffużjoni jiġi sovrappost bi plott lineari segmentat li jgħaqqad il-medji tal-konċentrazzjoni ponderati skont id-daqs tal-kampjun irreplikat. Devjazzjoni kbira ta' dan il-plott lineari segmentat minn monotoniċità tindika l-ħtieġa possibbli li jintużaw testijiet mingħajr tendenza. B'mod alternattiv, jistgħu jintużaw testijiet formali. Test formali sempliċi huwa għall-komputazzjoni tal-kuntrasti lineari u kwadratiċi tal-medji tal-konċentrazzjoni. Jekk il-kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u l-kuntrast lineari ma jkunx sinifikanti, din hija indikazzjoni ta' problema possibbli bil-monotoniċità, li għandha tiġi evalwata aktar mill-plotts. Meta n-normalità jew l-omoġeneità tal-varjanza tikkostitwixxi kwistjoni, dawn il-kuntrasti jistgħu jinbnew minn dejta ttrasformata skont l-ordni tal-klassifikazzjoni. Jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi, bħat-test ta' Bartholomew, għall-monotoniċità, iżda dawn iżidu l-kumplessità.

▼M7

Figura 2

Flow-Chart bil-Kejl tad-Daqs tal-NOEC (it-tul u l-piż)



(*) Dawn ir-risponsi qatt ma jissodisfaw is-suppożizzjonijiet għall-analiżi jew il-mudelli parametriċi.

Sakemm id-dejta ma tkunx konsistenti mar-rekwiżiti għal dawn it-testijiet, l-NOEC tiġi ddeterminata minn applikazzjoni b'tendenza rigressiva tat-test ta' Williams jew ta' Jonckheere-Terpstra. OECD (2006) jipprovdi dettalji dwar dawn il-proċeduri. Għad-dejta li mhijiex konsistenti mar-rekwiżiti għal test b'tendenza rigressiva, jista' jintuża t-test ta' Dunnett jew ta' Tamhane-Dunnett (T3), li t-tnejn li huma għandhom aġġustamenti inkorporati għall-multipliċità. Dawn it-testijiet jassumu n-normalità u, fil-każ ta' Dunnett, l-omoġeneità tal-varjanza. Meta dawk il-kundizzjonijiet ma jiġux issodisfati, jista' jintuża t-test mhux parametriku ta' Dunn. OECD (2006) jinkludi dettalji għal dawn it-testijiet kollha. Il-figura 2 tagħti ħarsa ġenerali lejn kif tista' ssib it-test tal-għażla tiegħek.

It-Tifqis tal-Bajd u s-Sopravivenza tal-Larva

Id-dejta hija dwar il-proporzjonijiet ta' bajd li jfaqqas jew larva li tibqa' ħajja f'repliki individwali. Dawn il-proporzjonijiet għandhom jiġu vvalutati għall-varjanza extra-binomjali, li hija komuni iżda mhux universali għal dan il-kejl. Il-flowchart fil-figura 3 hija gwida għat-test tal-għażla; ara t-test għal deskrizzjonijiet iddettaljati.

Normalment jintużaw żewġ testijiet. Dawn huma t-test ta' Tarone C(α) (Tarone, 1979) u l-chi-squared tests, kull wieħed applikat separatament għal kull konċentrazzjoni tat-test. Jekk tinstab varjanza extra-binomjali f'konċentrazzjoni waħda tat-test, mela allura għandhom jintużaw metodi li jakkomodaw.

Formula 1

It-test ta' Tarone C (α) (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \left(\frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} \right) - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

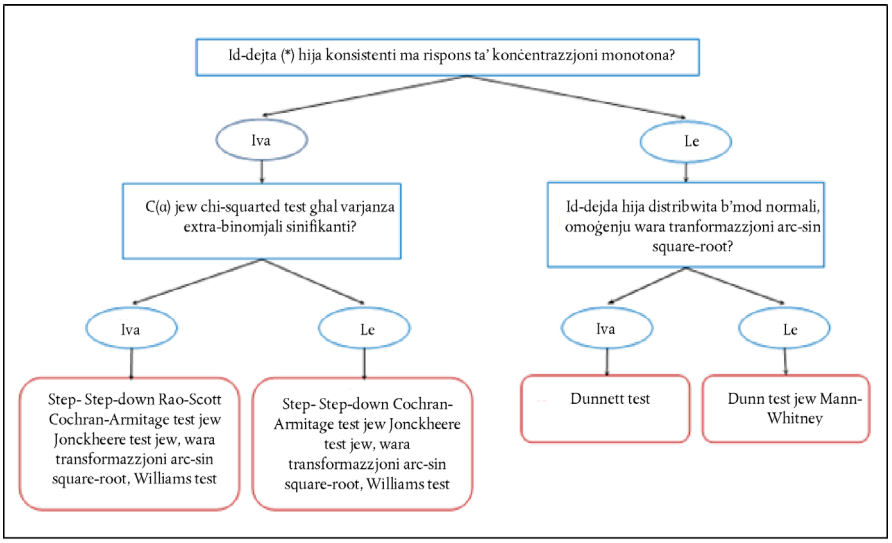
fejn $\hat{p}$ huwa l-proporzjon medju għal konċentrazzjoni partikolari, **m** huwa l-għadd ta' tankijiet irreplikati, $\mathbf{n_j}$ huwa l-għadd ta' suġġetti fir-replika **j** u $\mathbf{x_j}$ huwa l-għadd

▼M7

ta' suġġetti f'dik ir-replika li tirrispondi, eż. mhux imfaqqsin jew mejta. Dan it-test jiġi applikat għal kull konċentrazzjoni separatament. Dan it-test jista' jitqies bħala test aġġustat tal-chi-square, iżda s-simulazzjonijiet b'qawwa limitata magħmula minn Tarone wrew li huwa aktar b'saħħtu minn test tal-chi-square.

Figura 3

Flow Chart tal-NOEC għat-Tifqis tal-Bajd u l-Mortalità tal-Larva



(*) Id-dejta hija proporzjon irreplikat.

Meta ma jkun hemm ebda evidenza sinifikanti ta' varjanza extra-binomjali, jista' jintuża t-test b'tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage. Dan it-test jinjora r-repliki, għalhekk, fejn ikun hemm tali evidenza, huwa rrakkomandat li jsir aġġustament ta' Rao-Scott għat-test ta' Cochran-Armitage (RSCA), li jieħu f'kunsiderazzjoni r-repliki, id-daqsijiet tar-repliki u l-varjanza extra-binomjali. It-testijiet alternattivi jinkludu t-testijiet b'tendenza rigressiva ta' Williams u Jonckheere-Terpstra u t-test ta' Dunnett kif deskritti għall-kejl tad-daqs. Dawn it-testijiet japplikaw irrispettivament minn jekk ikunx hemm varjanza extra-binomjali, iżda għandhom qawwa kemmxejn aktar baxxa (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

L-Ewwel jew l-Aħħar Jum tat-Tifqis jew tal-Għawma

Ir-rispons huwa inteġer, li jagħti l-jum tat-test li fih tiġi osservata l-osservazzjoni indikata għal tank irreplikat partikolari. Il-medda tal-valuri ġeneralment tkun limitata ħafna u sikwit ikun hemm proporzjonijiet kbar ta' valuri marbuta, pereżempju, jiġi osservat l-istess l-ewwel jum ta' tifqis fir-replikati ta' kontroll u forsi f'konċentrazzjoni waħda jew żewġ konċentrazzjonijiet baxxi tat-test. Testijiet parametriċi bħal Williams u Dunnett mhumiex addattati għal tali dejta. Sakemm ma jkunx hemm evidenza fuq non-monotoniċità serja, it-test b'tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra huwa b'saħħtu ħafna għad-detezzjoni tal-effetti tas-sustanza kimika tat-test. Altrimenti, jista' jintuża t-test ta' Dunn.

Anormalitajiet tal-Larva

Ir-rispons huwa l-għadd ta' larva li b'xi mod tinstab li hija anormali. Dan ir-rispons ta' spiss ikun ta' inċidenza baxxa u jesperjenza wħud mill-istess problemi bħall-ewwel jum tat-tifqis, kif ukoll xi drabi juri rispons erratiku għall-konċentrazzjoni. Jekk id-dejta mill-inqas bejn wieħed u ieħor issegwi forma ta' konċentrazzjoni monotona, it-test b'tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra huwa b'saħħtu għall-identifikazzjoni tal-effetti. Altrimenti, jista' jintuża t-test ta' Dunn.

▼**M7**

REFERENZI

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Appendiċi 6

GWIDA STATISTIKA GĦALL-ESTIMI TA' RIGRESSJONI

Ġenerali

L-osservazzjonijiet użati biex jiddaħħal mudell huma medji rreplikati (tul u piż) jew proporzjonijiet irreplikati (tifqis tal-bajd u mortalità tal-larva) (OECD 2006).

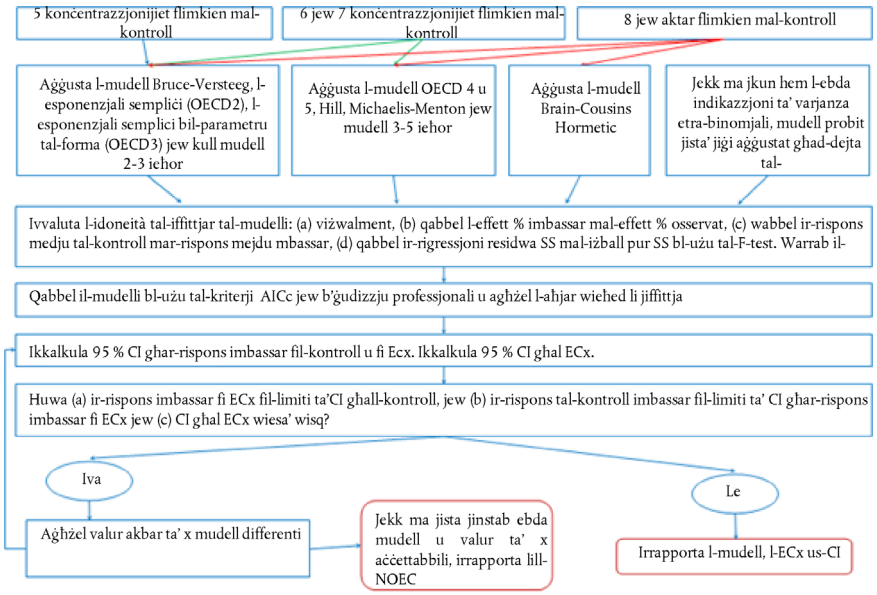
Ġeneralment, hija rrakkomandata rigressjoni ponderata li tuża d-daqs tal-kampjun irreplikat bħala l-piż. Huma possibbli skemi ta' ponderazzjoni oħrajn, bħall-ponderazzjoni b'rispons medju mbassar jew kombinazzjoni ta' dan u d-daqs tal-kampjun irreplikat. Mhix irrakkomandata l-ponderazzjoni b'varjanza reċiproka fi ħdan il-kampjun ta' konċentrazzjoni (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Kwalunkwe trasformazzjoni tar-risponsi qabel analiżi għandha tippreserva l-indipendenza tal-osservazzjonijiet u l-EC_x u l-limiti ta' kunfidenza tagħha għandhom jiġu espressi fl-unitajiet oriġinali tal-kejl, aktar milli f'unitajiet ittrasformati. Pereżempju, bidla ta' 20 % fil-logaritmu tat-tul mhijiex ekwivalenti għal bidla ta' 20 % fit-tul (Lyles *et.al* 2008, Draper and Smith 1999).

Il-flowchart fil-figura 4 tagħti ħarsa ġenerali lejn l-estimi tal-ECx. Id-dettalji huma deskritti fit-test ta' hawn taħt.

Figura 4

Flow chart għal EC_x Stima tat-Tul, tal-Piż jew tal-Proporzjon Medju Replikat tat-Tifqis tal-Bajd jew tal-Mortalità tal-Larva, ara t-test għal aktar dettalji



Kunsiderazzjonijiet għat-Tifqis tal-Bajd u għall-Mortalità tal-Larva

Għat-tifqis tal-bajd u l-mortalità tal-larva, huwa ġeneralment aħjar li jiddaħħal mudell ta' tnaqqis, sakemm ma jiddaħħalx mudell probit kif deskritt hawn taħt. Jiġifieri, wieħed għandu jimmudella l-proporzjon ta' bajd li ma jfaqqasx jew ta' larvi li jmutu. Ir-raġuni għal dan hija li EC_x tirreferi għal konċentrazzjoni li fiha jkun hemm bidla ugwali għal x % tar-rispons medju tal-kontroll. Jekk ikun hemm 5 % tal-bajd fil-kontroll li ma jfaqqsux u wieħed jimmudella n-nuqqas ta' tifqis, mela allura l-EC_{20} tirreferi għal konċentrazzjoni li fiha jkun hemm bidla

▼M7

ugwali għal 20 % tal-5 % tal-bajd fil-kontroll li ma jfaqqsux, jiġifieri bidla ta' 0,2 × 0,05 = 0,01 jew punt perċentwal wieħed għal 6 % tal-bajd li ma jfaqqsux. Din il-bidla żgħira ma tistax tiġi stmata bi kwalunkwe mod sinifikanti mid-dejta disponibbli u mhijiex bijoloġikament importanti. Filwaqt li, jekk wieħed jimmudella l-proporzjon tal-bajd li jfaqqsu, il-proporzjon tal-kontroll ikun 95 % f'dan l-eżempju u tnaqqis ta' 20 % mill-medja tal-kontroll ikun ifisser bidla ta' 0,95 × 0,2 = 0,18, għalhekk, minn rata ta' suċċess tat-tifqis ta' 95 % għal suċċess ta' tifqis ta' 77 % (= 95-18) u l-konċentrazzjoni tal-effetti tista' tiġi stmata u preżumibbilment hija ta' interess akbar. Din ma tikkostitwixxi ebda kwistjoni bil-kejl tad-daqs, għalkemm l-effetti avversi fuq id-daqs ġeneralment ifissru tnaqqis fid-daqs.

Mudelli għad-Daqs (tul jew piż) u s-Suċċess tat-Tifqis tal-Bajd jew is-Sopravivenza tal-Larva.

Għajr għall-mudell ormetiku ta' Brain-Cousens, dawn il-mudelli kollha huma deskritti u rrakkomandati fl-OECD (2006). Dawn il-mudelli, imsejħa OECD 2-5, huma diskussi wkoll għall-esperimenti tal-ekotossiċità fi Slob (2002). Ovvjament, hemm ħafna mudelli oħrajn li jistgħu jkunu utli. Bunke, *et al*. (1999) isemmi bosta mudelli li mhumiex inklużi hawnhekk u hemm għadd kbir ta' referenzi għal mudelli oħrajn. Dawk imsemmija hawn taħt huma ssuġġeriti bħala partikolarment xierqa fl-esperimenti tal-ekotossiċità u jintużaw ħafna.

B'5 konċentrazzjonijiet tat-test flimkien mal-kontroll

— Bruce-Versteeg

— Esponenzjali Sempliċi (OECD 2)

— Esponenzjali bil-parametru tal-forma (OECD 3)

— Esponenzjali Sempliċi b'Livell Inferjuri (OECD 4)

B'6 konċentrazzjonijiet tat-test jew aktar flimkien mal-kontroll

— Esponenzjali b'parametru tal-forma u livell inferjuri (OECD 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Fejn ikun hemm evidenza viżiva ta' ormeżi (mhux probabbli b'suċċess ta' tifqis tal-bajd jew sopravivenza tal-larva, iżda xi drabi osservata fl-osservazzjonijiet tad-daqs)

— Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989)

Mudelli alternattivi għall-falliment fit-tifqis tal-bajd u l-mortalità tal-larva

— Il-mudelli dejjem jiżdiedu għal dawn ir-risponsi jistgħu jiddaħħlu b'mudelli probit (jew loġistiċi) jekk ma jkun hemm ebda evidenza ta' varjanza extra-binomjali u l-inċidenza tal-kontroll tkun stmata fil-mudell addattat. Dan mhuwiex il-metodu ppreferut, minħabba li jittratta l-individwu, mhux ir-replika, bħala l-unità tal-analiżi (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

L-idoneità tal-adattament ta' mudell waħdieni

— Qabbel b'mod viżiv it-tnaqqis perċentwali osservat u mbassar f'kull konċentrazzjoni tat-test (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper and Smith 1999).

— Qabbel il-medja kwadratika tal-iżball ta' rigressjoni mal-medja kwadratika tal-iżball pur bl-użu ta' F-test (Draper and Smith 1999).

— Ivverifika li kull terminu fil-mudell huwa differenti b'mod sinifikanti minn żero (jiġifieri ddetermina jekk it-termini kollha użati fil-mudell humiex importanti), (Motulsky and Christopoulos 2004).

▼M7

— Il-plotts ta' residwi minn rigressjoni kontra l-konċentrazzjoni tat-test, possibbilment fuq skala log(conc). Ma għandu jkun hemm ebda mudell għal dan il-plott; il-punti għandhom ikunu mifruxa b'mod aleatorju madwar linja orizzontali f'għoli ta' żero.

— Id-dejta għandha tiġi evalwata għan-normalità u għall-omoġeneità tal-varjanza bl-istess mod kif indikat fl-Appendiċi 5.

— Barra minn hekk, in-normalità tar-residwi dwar il-mudell ta' rigressjoni għandha tiġi vvalutata bl-użu tal-istess metodi indikati fl-Appendiċi 5 għar-residwi minn ANOVA

Qabbel il-mudelli

— Uża l-kriterji AICc ta' Akiake Valuri ta' AICc iżgħar juru adattamenti aħjar u jekk AICc(B)-AICc(A)≥10, il-mudell A huwa kważi ċertament aħjar mill-mudell B (Motulsky and Christopoulos (2004).

— Qabbel iż-żewġ mudelli viżwalment skont kemm jissodisfaw tajjeb il-kriterji tal-mudell waħdieni msemmija fuq.

— Huwa rrakkomandat il-prinċipju ta' parsimonja, fejn jintuża l-aktar mudell sempliċi li jkun adattat b'mod raġonevoli għad-dejta (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

Stima tal-kwalità tal-EC_x

L-intervall ta' kunfidenza (confidence interval — CI) għall-EC_x ma għandux ikun wiesa' żżejjed. Huwa meħtieġ ġudizzju statistiku sabiex jiġi deċiż kemm jista' jkun wiesa' l-intervall ta' kunfidenza u l-EC_x jibqgħu utli. Is-simulazzjonijiet għall-mudelli ta' rigressjoni adattati għat-tifqis tal-bajd u d-dejta dwar id-daqs juru li madwar 75 % tal-intervalli ta' kunfidenza għal EC_x (x=10, 20 jew 30) huma mifruxa fuq mhux aktar minn żewġ konċentrazzjonijiet tat-test. Dan jipprovdi gwida ġenerali għal x'inhu aċċettabbli u gwida prattika għal dak li jista' jinkiseb. Bosta awturi jasserixxu l-ħtieġa li jiġu rrapportati l-intervalli ta' kunfidenza għall-parametri tal-mudelli kollha u li l-intervalli ta' kunfidenza wiesgħa għall-parametri tal-mudelli jindikaw mudelli inaċċettabbli (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environment Canada 2005).

Is-CI għall-EC_x (jew kwalunkwe parametru ta' mudell ieħor) ma għandux jinkludi żero (Motulsky and Christopoulos 2004). Din hija r-rigressjoni ekwivalenti għad-differenza sinifikanti minima li sikwit tiġi ċċitata fl-approċċi tal-ittestjar ipotetiku (eż. Wang *et al* 2000). Hija tikkorrespondi għall-intervall ta' kunfidenza sabiex ir-risponsi medji fl-LOEC ma jkunux jinkludu l-medja tal-kontroll. Wieħed għandu jistaqsi jekk l-estimi tal-parametru humiex xjentifikament plawżibbli. Pereżempju, jekk l-intervall ta' kunfidenza għal y0 ikun ±20 %, ma hija plawżibbli ebda stima ta' EC_{10}. Jekk il-mudell jipprevedi effett ta' 20 % f'konċentrazzjoni C u l-effett massimu osservat f'C u konċentrazzjonijiet aktar baxxi jkun 10 %, mela allura l-EC_{20} ma tkunx plawżibbli (Motulsky and Christopoulos 2004, Wang *et al*. 2000, Environment Canada 2005).

EC_x ma għandhiex tirrikjedi estrapolazzjoni barra l-medda ta' konċentrazzjonijiet pożittivi (Draper and Smith 1999, OECD 2006). Pereżempju, gwida ġenerali tista' tkun li l-EC_x ma tkunx aktar minn madwar 25 % taħt l-inqas konċentrazzjoni ttestjata jew aktar mill-ogħla konċentrazzjoni ttestjata.

REFERENZI

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. ASSAĠĠ TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ĦUT FUQ ŻMIEN QASIR

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 229 tal-OECD (2012). Il-ħtieġa li jiġi żviluppat u vvalidat assaġġ tal-ħut li jkun jista' jidentifika ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali ġejja mit-tħassib li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkawżaw effetti avversi kemm fil-bnedmin kif ukoll fl-organiżmi selvaġġi minħabba l-interazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi mas-sistema endokrinali. Fl-1998, l-OECD bdiet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi l-linji gwida eżistenti u tiżviluppa linji gwida ġodda għall-iskrinjar u l-ittestjar ta' sustanzi li potenzjalment ifixklu s-sistema endokrinali. Element minnhom tal-attività kien li tiġi żviluppata linja gwida tat-test għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali tal-ispeċi tal-ħut. L-Assaġġ tar-Riproduzzjoni tal-Ħut Fuq Żmien Qasir għadda minn programm estensiv ta' validazzjoni li jikkonsisti fi studji interlaboratorji b'sustanzi kimiċi magħżula biex jintwerew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li jħallu impatt fuq ir-riproduzzjoni tal-ħut b'diversi mekkaniżmi, inklużi modalitajiet endokrinali (1, 2, 3, 4, 5). Il-punti tat-tmiem kollha tal-linja gwida tat-test tal-OECD ġew ivvalidati fuq il-karpjun buras u subsett ta' punti tat-tmiem ġie vvalidat fuq il-medaka Ġappuniża (jiġifieri l-vitelloġenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji) u fuq iż-żebra (jiġifieri vitelloġenina). Il-ħidma ta' validazzjoni ġiet riveduta permezz ta' evalwazzjoni bejn il-pari minn bord ta' esperti nnominati mill-Koordinaturi Nazzjonali tal-Programm tal-Linji Gwida tat-Test tal-OECD (6) u minn bord ta' esperti indipendenti kkummissjonati mill-Aġenzija għall-Ħarsien Ambjentali tal-Istati Uniti (29). L-assaġġ mhuwiex imfassal biex jidentifika mekkaniżmi speċifiċi ta' tfixkil ormonali minħabba li l-annimali tat-test għandhom assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali (HPG) intatta, li jista' jkollha rispons għal sustanzi kimiċi li għandhom impatt fuq l-assi HPG f'livelli differenti.

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi assaġġ ta' skrinjar *in vivo* li fih ħut maskili sesswalment matur u ħut femminili li jkun qed ibid jinżammu flimkien u jiġu esposti għal sustanza kimika matul parti limitata miċ-ċiklu tal-ħajja tagħhom (21 jum). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment ta' 21 jum, jitkejlu żewġ punti ta' tmiem bijomarkaturi fl-irġiel u n-nisa bħala indikaturi tal-attività endokrinali tas-sustanza kimika tat-test; dawn il-punti ta' tmiem huma l-vitelloġenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji. Il-vitelloġenina titkejjel fil-karpjun buras, fil-medaka Ġappuniża u fiż-żebra, filwaqt li l-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karpjun buras u fil-medaka Ġappuniża. Barra minn hekk, il-fekondità kwantitattiva tiġi mmonitorjata kuljum matul it-test. Il-gonadi jiġu ppreservati wkoll u l-istopatoloġija tista' tiġi evalwata sabiex tkun ivvalutata l-idoneità riproduttiva tal-annimali tat-test u tiżdied mal-piż tal-evidenza ta' punti tat-tmiem oħrajn.

3. Dan il-bijoassaġġ iservi bħala assaġġ ta' skrinjar riproduttiv *in vivo* u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi li Jfixklu s-Sistema Endokrinali" (30). F'dan il-Qafas Kunċettwali, l-Assaġġ tar-Riproduzzjoni Fuq Żmien Qasir huwa propost fil-Livell 3 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi dejta dwar il-mekkaniżmu/i jew il-passaġġ(i) endokrinali magħżula.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. Normalment il-vitelloġenina (VTG) tiġi prodotta mill-fwied ta' vertebrati ovipari femminili bħala rispons għall-estroġenu endoġenu li jkun qed jiċċirkola. Hija prekursur tal-proteini tal-isfar tal-bajd u, ladarba tiġi prodotta fil-fwied, tgħaddi mad-demm u tidħol fl-ovarji, fejn tiġi assorbita u modifikata mill-bajd li jkun qed jiżviluppa. Il-vitelloġenina hija kważi intraċċabbli fil-plażma ta' ħut femminili u maskili immaturi għaliex ma għandhomx biżżejjed estroġenu jiċċirkola; madankollu, il-fwied kapaċi jissintetizza u jnixxi l-vitelloġenina bħala rispons għal stimulazzjoni tal-estroġenu eżoġenu.

▼M7

5. Il-kejl tal vitelloġenina jservi għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom diversi modi ta' azzjoni estroġenika. Id-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi tista' ssir bil-kejl tal-induzzjoni tal-vitelloġenina fil-ħut maskili, u ġiet dokumentata sew fil-letteratura xjentifika evalwata bejn il-pari (eż. (7)). L-induzzjoni tal-vitelloġenina ntweriet ukoll wara espożizzjoni għal androġeni aromatizzabbli (8, 9). Tnaqqis fil-livell ta' estroġenu li jiċċirkola fin-nisa, pereżempju, permezz tal-inibizzjoni tal-aromataži li tikkonverti l-androġenu endoġenu f'estroġenu naturali 17β-estradjol, jikkawża tnaqqis fil-livell ta' vitelloġenina, li jintuża għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom karatteristiċi inibitorji tal-aromataži (10, 11). Ir-rilevanza bijoloġika tar-rispons tal-vitelloġenina wara inibizzjoni estroġenika/tal-aromataži hija stabbilita u ġiet iddokumentata b'mod estensiv. Madankollu, huwa possibbli wkoll li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata mit-tossiċità ġenerali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità.

6. Ġew żviluppati b'suċċess diversi metodi ta' kejl u dawn ġew standardizzati għall-użu ta' rutina. Dan huwa l-każ fil-metodi ta' Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku (ELISA) speċifiċi għall-ispeċi li jużaw l-immunokimika għall-kwantifikazzjoni tal-VTG prodotta f'kampjuni żgħar tad-demm jew tal-fwied miġbura minn ħut individwali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Għall-kejl tal-VTG jittieħed kampjun tad-demm tal-karpjun buras, id-demm taż-żebra jew l-omoġenat tar-ras/denb, u l-fwied tal-medaka. Fil-medaka, hemm korrelazzjoni tajba bejn il-VTG imkejla mid-demm u mill-fwied (19). L-Appendiċi 6 jipprovdi l-proċeduri rrakkomandati għall-ġbir tal-kampjuni għal analiżi tal-VTG. Kits għall-kejl tal-vitelloġenina jistgħu jinkisbu faċilment; dawn il-kits għandhom ikunu bbażati fuq metodu ELISA vvalidat li jkun speċifiku għall-ispeċi.

7. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji f'ħut maskili ta' ċerti speċijiet jidhru fuq barra, huma kwantifikabbli u jirrispondu għal-livelli ta' androġeni endoġeni li jiċċirkolaw; dan huwa l-każ għall-karpjun buras u l-medaka — iżda mhux għaż-żebra, li ma għandhiex karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli. In-nisa jżommu l-kapaċità li jiżviluppaw karatteristiċi sesswali sekondarji maskili, meta jiġu esposti għal sustanzi kimiċi androġeniċi fl-ilma. Hemm bosta studji disponibbli fil-letteratura xjentifika li jiddokumentaw dan it-tip ta' rispons fil-karpjun buras (20) u fil-medaka (21). Tnaqqis fil-karatteristiċi sesswali sekondarji fl-irġiel għandu jiġi interpretat b'kawtela minħabba saħħa statistika dgħajfa, u għandu jkun ibbażat fuq ġudizzju espert u l-piż tal-evidenza. Hemm limitazzjonijiet dwar l-użu taż-żebra f'dan assaġġ, minħabba n-nuqqas ta' karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli li jirrispondu għal sustanzi kimiċi b'effetti androġeniċi.

8. Fil-karpjun buras, l-indikatur ewlieni ta' esponiment androġeniku eżoġenu huwa l-għadd ta' tuberkuli tan-namra (nuptial tubercles) li jinsabu fuq imnieħer il-ħuta femminili. Fil-medaka, l-għadd ta' proċessi papillari jikkostitwixxi l-markatur ewlieni ta' esponiment eżoġenu għal sustanzi kimiċi androġeniċi f'ħut femminili. L-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B jindikaw il-proċeduri rrakkomandati li għandhom jiġu segwiti għall-evalwazzjoni tal-karatteristiċi sesswali fil-karpjun buras u fil-medaka, rispettivament.

9. L-assaġġ ta' 21 jum jinkludi l-evalwazzjoni tal-produzzjoni kwantitattiva tal-bajd u l-preservazzjoni tal-gonadi għal eżaminazzjoni fakultattiva tal-istopatoloġija. Xi awtoritajiet regolatorji jistgħu jirrikjedu dan il-punt ta' tmiem addizzjonali għal evalwazzjoni aktar sħiħa tal-idoneità riproduttiva tal-annimali tat-test, jew f'dawk il-każijiet fejn il-vitelloġenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji ma rrispondewx għall-esponiment kimiku. Għalkemm xi punti ta' tmiem jistgħu jkunu dijanjostiċi ħafna (eż. induzzjoni tal-VTG fl-irġiel u formazzjoni tat-tuberkuli fin-nisa), mhux il-punti tat-tmiem kollha (eż. fekondità u istopatoloġija gonadali) fl-assaġġ huma maħsuba biex jidentifikaw b'mod inekwivoku l-mekkaniżmi ċellulari speċifiċi ta' azzjoni. Minflok, il-firxa ta' punti ta' tmiem, b'mod kollettiv, tippermetti li jsiru

▼M7

inferenzi fir-rigward tad-disturbanzi endokrinali possibbli u, b'hekk, tipprovdi gwida għal aktar ittestjar. Għalkemm mhijiex speċifika għall-endokrini, il-fekondità, minħabba s-sensittività murija minnha fost is-sustanzi kimiċi attivi endokrinali magħrufa (5), hija punt ta' tmiem importanti li jrid jiġi inkluż, minħabba li meta dan u punti ta' tmiem oħrajn ma jkunux affettwati, wieħed huwa aktar kunfidenti li kompost mhux probabbli jkun attiv fis-sistema endokrinali. Madankollu, meta l-fekondità tkun affettwata, hija tikkontribwixxi ħafna għall-inferenzi fil-piż tal-evidenza. F'dan il-metodu ta' ttestjar hija pprovduta gwida dwar l-interpretazzjoni tad-dejta u l-aċċettazzjoni tar-riżultati tat-test.

10. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma mogħtija fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Fl-assaġġ, il-ħut maskili u dawk femminili li jkunu fi stat riproduttiv jiġu esposti f'reċipjenti tat-test flimkien. L-istat adult u riproduttiv tagħhom jippermetti sabiex issir differenzjazzjoni ċara bejn is-sessi, u b'hekk tkun tista' ssir analiżi relatata mas-sess ta' kull punt ta' tmiem, u jiżgura s-sensittività tagħhom lejn sustanzi kimiċi esoġeni. Fi tmiem it-test, is-sess jiġi kkonfermat permezz ta' eżami makroskopiku tal-gonadi wara ftuħ ventrali tal-addome b'imqass. Fl-Appendiċi 2 tingħata ħarsa ġenerali lejn il-kundizzjonijiet rilevanti tal-bijoassaġġ. Normalment, l-assaġġ jinbeda b'kampjun ta' ħut minn popolazzjoni li tkun f'kundizzjoni riproduttiva; ma għandhomx jintużaw annimali li qed jixjieħu. Fis-sezzjoni dwar l-Għażla tal-ħut hija pprovduta gwida dwar l-età tal-ħut u dwar l-istatus riproduttiv. L-assaġġ isir permezz ta' tliet konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi li jintużaw għall-espożizzjoni kif ukoll kontroll tal-ilma, u kontroll tas-solvent jekk ikun hemm bżonn. Għaż-żebra jintużaw żewġ reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 5 irġiel u 5 nisa). Għall-karpjun buras jintużaw erba' reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 2 irġiel u 4 nisa). Dan isir biex tiġi akkomodata l-imġiba territorjali tal-karpjun buras maskili filwaqt li jinżamm assaġġ b'saħħtu biżżejjed. Għall-medaka jintużaw erba' reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 3 irġiel u 3 nisa). L-espożizzjoni ssir għal 21 jum u l-kampjunar tal-ħut isir fil-21 jum tal-esponiment. Il-fekondità kwantitattiva tiġi mmonitorjata kuljum.

12. Mal-kampjunar fil-jum 21, l-annimali kollha jinqatlu bla tbatija. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karpjun buras u fil-medaka (ara l-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B); fiż-żebra u l-karpjun buras jinġabru kampjuni tad-demm għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina, inkella jistgħu jinġabru r-ras/id-denb għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina fiż-żebra (Appendiċi 6); fil-medaka, il-fwied jinġabar għall-analiżi tal-VTG (Appendiċi 6); il-gonadi jinżammu jew magħqudin flimkien bħala ħaġa sħiħa jew inkella mifrudin għal evalwazzjoni istopatoloġika potenzjali (22).

IL-KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI TAT-TEST

13. Biex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità fil-kontrolli tal-ilma (jew tas-solvent) ma għandhiex taqbeż l-10 fil-mija fi tmiem il-perjodu ta' esponiment;

— matul il-perjodu ta' esponiment, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għandha tilħaq minimu ta' 60 fil-mija tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV);

— it-temperatura tal-ilma ma għandhiex tvarja b'aktar minn ± 1,5 °C bejn ir-reċipjenti tat-test fi kwalunkwe ħin matul il-perjodu ta' esponiment u għandha tinżamm fi ħdan 2 °C tal-meded tat-temperaturi speċifikati għall-ispeċi tat-test (Appendiċi 2);

— għandha tkun disponibbli evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla;

▼M7

— evidenza li l-ħut qed jirriproduċi b'mod attiv fir-repliki kollha qabel Jinbeda esponiment kimiku u fir-repliki ta' kontroll matul it-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

14. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

a. ossiġenometri u apparati li jkejlu l-pH;

b. tagħmir għad-determinazzjoni tal-ebusija u l-alkalinità tal-ilma;

c. apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment monitoraġġ kontinwu;

d. tankijiet magħmulin minn materjal kimiku inerti u ta' kapaċità adattata b'rabta mad-densità rrakkomandata tat-tagħbija u tal-istokkjar (ara l-Appendiċi 2);

e. sottostrat tal-bidien għall-karpjun buras u ż-żebra, l-Appendiċi 4 jagħti d-dettalji neċessarji.

f. bilanċ preċiż biżżejjed (jiġifieri preċiż sa ± 0.5mg).

Ilma

15. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwat fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6.5 sa 8.5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' ± 0.5 unitajiet tal-pH. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma tad-dilwizzjoni ma jinfluwenzax bla bżonn ir-riżultat tat-test (pereżempju billi jbiddel is-sustanza kimika tat-test); għandhom jittieħdu kampjuni f'intervalli sabiex jiġu analizzati. Għandu jsir il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} u SO_4^{2-}), il-pestiċidi (eż. pestiċidi organofosforiċi totali u pestiċidi organokloriniċi totali), il-karbonju organiku totali u s-solidi sospiżi, pereżempju, kull tliet xhur meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li huwa relattivament kostanti fil-kwalità. Jekk ikun intwera li l-kwalità tal-ilma hija kostanti matul tal-anqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jkunu inqas spissi u l-intervalli jistgħu jittawlu (eż. kull sitt xhur). Xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma b'dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 3.

Is-soluzzjonijiet tat-test

16. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jiġu preparati billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Idealment, is-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi ppreparata permezz ta' sempliċi tħallit jew theżżiż tas-sustanza kimika tat-test f'ilma tad-dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. tħawwid jew ultrasonikazzjoni). Biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija konċentrata adegwata jistgħu jintużaw kolonni ta' saturazzjoni (kolonni ta' solubilità). L-użu ta' portatur ta' solvent mhuwiex rakkomandat. Madankollu, f'każ li jkun hemm bżonn ta' solvent, fl-istess ħin għandu jsir kontroll tas-solvent, fl-istess konċentrazzjoni tas-solvent bħat-trattamenti kimiċi; Għal sustanzi kimiċi li diffiċli jiġu ttestjati, solvent jista' teknikament ikun l-aħjar soluzzjoni; għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli (23). L-għażla tas-solvent tiġi ddeterminata mill-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza jew tat-taħlita. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD jirrakkomanda massimu ta' 100µl/l, li għandu jiġi osservat. Madankollu, reviżjoni riċenti (24) enfasizzat fuq tħassib addizzjonali meta jintużaw solventi għall-ittestjar tal-attività fis-sistema endokrinali. Għalhekk, huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjoni tas-solvent, jekk ikun meħtieġ, tiġi minimizzata meta dan ikun teknikament fattibbli (skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test).

▼M7

17. Għandha tintuża sistema ta' test bi fluss kontinwu. Sistema bħal din tiddistribwixxi u tiddilwixxi b'mod kontinwu soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) sabiex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u tal-ilma tad-dilwizzjoni għandhom jiġu ċċekkjati kull ċertu żmien, idealment kuljum, matul it-test u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik ta' grad baxx jew materjal ieħor li jista' jkun fih sustanzi kimiċi bijoloġikament attivi. Meta jkun qed jintgħażel il-materjal għas-sistema bi fluss kontinwu, għandha titqies il-possibilità li s-sustanza kimika tat-test tiġi adsorbita f'dan il-materjal.

Iż-żamma tal-ħut

18. Il-ħut tat-test għandu jintgħażel minn popolazzjoni tal-laboratorju, idealment minn stokk wieħed, li jkun idderra għal mill-inqas ġimgħatejn qabel it-test fil-kondizzjonijiet ta' kwalità tal-ilma u ta' illuminazzjoni li jkunu simili għal dawk użati fit-test. Importanti li r-rata tat-tagħbija u d-densità tal-istokkjar (għad-definizzjonijiet, ara l-Appendiċi 1) jkunu xierqa għall-ispeċi tat-test użata (ara l-Appendiċi 2).

19. Wara perjodu ta' 48 siegħa li fih il-ħut jitħallew joqogħdu, jiġu rreġistrati l-mortalitajiet u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

— mortalitajiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: jintrema l-lott kollu;

— mortalitajiet ta' bejn 5 % u 10 % tal-popolazzjoni: akklimatizzazzjoni għal sebat ijiem oħra; jekk ikun hemm mortalità ogħla minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, il-lott kollu jitwarrab;

— mortalitajiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-lott jiġi aċċettat.

20. Matul il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, fil-perjodu ta' qabel l-esponiment, jew matul il-perjodu ta' esponiment l-ħut m'għandux jingħata kura għal mard.

Perjodu ta' qabel l-esponiment u l-għażla tal-ħut

21. Il-perjodu ta' qabel l-esponiment ta' bejn ġimgħa u ġimgħatejn huwa rrakkomandat għall-annimali mqiegħda f'reċipjenti simili għat-test proprju. Matul il-perjodu ta' żamma u matul il-fażi ta' esponiment, il-ħut għandu jiġi mitmugħ *ad libitum*. Il-fażi ta' esponiment tinbeda b'ħut adult sesswalment dimorfiku minn provvista tal-laboratorju ta' annimali maturi biżżejjed għar-riproduzzjoni (eż. b'karatteristiċi sesswali sekondarji li jidhru fir-rigward tal-karpjun buras u l-medaka), u li jkunu qed ibidu b'mod attiv. Għal gwida ġenerali biss (u dan ma għandux jitqies mingħajr l-osservazzjoni tal-istatus riproduttiv propju ta' lott partikolari ta' ħut), il-karpjuni buras għandu jkollhom madwar 20 (± 2) ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul ħajjithom. Il-medaka Ġappuniża għandu jkollha madwar 16 (± 2)il-ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul ħajjithom. Iż-żebra għandu jkollha madwar 16 (± 2)il-ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 26 ± 2 °C matul ħajjithom. Il-produzzjoni tal-bajd għandha tiġi vvalutata kuljum matul il-fażi ta' qabel l-esponiment. Huwa rrakkomandat li r-riproduzzjoni tiġi osservata fit-tankijiet irreplikati kollha qabel l-inklużjoni fil-fażi tal-esponiment tal-assaġġ. F'dan l-istadju, ma tistax tiġi pprovduta gwida kwantitattiva dwar il-produzzjoni tal-bajd mixtieqa ta' kuljum, iżda huwa relattivament komuni li jiġu osservati bidien medji ta' > 10 bajdiet/femminili/jum għal kull speċi. Għandu jintuża disinn bi blokki aleatorji skont l-output tal-produzzjoni tal-bajd sabiex jiġu allokati repliki għad-diversi livelli sperimentali bil-għan li tiġi żgurata distribuzzjoni bilanċjata tar-repliki.

▼M7

ID-DISINN TAT-TEST

22. Jintużaw tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, kontroll wieħed (tal-ilma) u, jekk ikun hemm bżonn, kontroll tas-solvent. Id-dejta tista' tiġi analizzata sabiex jiġu determinati differenzi statistikament sinifikanti bejn ir-risponsi għat-trattament u għall-kontroll. Dawn l-analiżijiet ser jindikaw jekk hemmx il-ħtieġa ta' ittestjar ulterjuri aktar fit-tul għal effetti avversi (jiġifieri, is-sopravivenza, l-iżvilupp, it-tkabbir u r-riproduzzjoni) għas-sustanza kimika, aktar milli għall-użu fil-valutazzjoni tar-riskju (25).

23. Għaż-żebra, fil-jum 21 tal-esperiment, jittieħdu kampjuni ta' rġiel u nisa minn kull livell ta' trattament (5 irġiel u 5 nisa f'kull wieħed miż-żewġ repliki) u mill-kontroll(i) għall-kejl tal-vitelloġenina. Għall-medaka, fil-jum 21 tal-esperiment, jittieħdu kampjuni ta' rġiel u nisa minn kull livell ta' trattament (3 irġiel u 3 nisa f'kull wieħed mill-erba' repliki) u mill-kontroll(i) għall-kejl tal-vitelloġenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji. Għall-karpjun buras, fil-jum 21 ta' esponiment, l-irġiel u n-nisa (2 irġiel u 4 nisa f'kull wieħed mill-erba' repliki) u mill-kontroll(i) jiġu kampjunati għall-kejl tal-vitelloġenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji. Hija meħtieġa valutazzjoni kwantitattiva tal-fekondità u t-tessuti gonadali għandhom jitqiegħdu sħaħ jew mifrudin tkun tista' ssir evalwazzjoni istopatoloġika, jekk tkun meħtieġa.

L-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

24. Għall-finijiet ta' dan it-test, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tiġi stabbiliti mill-konċentrazzjoni massima tollerata (MTC) li tiġi ddeterminata minn range finder jew minn dejta oħra dwar it-tossiċità, jew 10 mg/l, jew is-solubilità massima fl-ilma, skont liema tkun l-aktar baxxa. L-MTC hija definita bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test tas-sustanza kimika li twassal għal mortalità ta' inqas minn 10 %. L-użu ta' dan l-approċċ jassumi li teżisti dejta empirika dwar tossiċità akuta jew dejta oħra dwar it-tossiċità li minnha tista' tiġi stmata l-MTC. L-istima tal-MTC tista' ma tkunx eżatta u normalment teħtieġ ċertu ġudizzju professjonali.

25. Huma meħtieġa tliet konċentrazzjonijiet tat-test, spazjati b'fattur kostanti li ma jaqbiżx l-10, u kontroll ta' ilma tad-dilwizzjoni (u kontroll tas-solvent jekk ikun meħtieġ). Huwa rrakkomandat li l-fatturi ta' spazjar jkunu f'firxa ta' bejn 3.2 u 10.

PROĊEDURA

L-għażla u l-użin tal-ħut tat-test

26. Huwa importanti li fil-bidu tal-assaġġ tiġi minimizzata l-varjazzjoni fil-piż tal-ħut. Il-meded ta' daqsijiet adattati għall-ispeċi differenti rrakkomandati għall-użu f'dan it-test huma mogħtija fl-Appendiċi 2. Għal-lott kollu ta' ħut użat fit-test, il-medda tal-piżijiet individwali għall-ħut maskili u femminili fil-bidu tat-test għandha, jekk possibbli, tinżamm bejn ± 20 % tal-piż medju aritmetiku tal-istess sess. Huwa rrakkomandat li qabel it-test jintiżen sotto-kampjun tal-istokk tal-ħut sabiex jiġi stmat il-piż medju.

Kundizzjonijiet tal-Esponiment

Durata

27. It-test idum għaddej 21 jum, wara perjodu ta' qabel l-esponiment. Il-perjodu ta' qabel l-esponiment rrakkomandat huwa ta' bejn ġimgħa u ġimgħatejn.

Tmigħ

28. Il-ħut għandu jiġi mitmugħ *ad libitum* b'ikel addattat (Appendiċi 2) b'rata suffiċjenti biex tinżamm il-kundizzjoni tal-ġisem. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tkabbir mikrobiku u turbidità fl-ilma. Bħala gwida ġenerali, ir-razzjon ta' kuljum jista' jinqasam f'żewġ jew tliet porzjonijiet ugwali

▼M7

għal tmigħ multiplu kuljum, separat b'mill-inqas tliet sigħat bejn kull tmigħ. Huwa aċċettabbli li jingħata razzjon akbar uniku b'mod partikolari għal tmiem il-ġimgħa. Il-ħut m'għandux jingħata x'jiekol għal 12-il siegħa qabel il-kampjunar/nekroskopija.

29. L-ikel tal-ħut għandu jiġi evalwat għall-preżenza ta' kontaminanti bħal pestiċidi organokloriniċi, idrokarboni aromatiċi poliċikliċi (PAHs), bifenili poliklorinati (PCBs). Għandu jiġi evitat ikel b'livell għoli ta' fitoestroġeni li jista' jikkomprometti r-rispons tal-assaġġ għal agonisti magħrufa tal-estroġenu (eż. 17b- estradiol).

30. Ikel mhux mikul u materjal tar-rawt għandu jitneħħa mir-reċipjent tat-test tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa, eż. billi l-qiegħ ta' kull tank jitnaddaf sew permezz ta' sifun.

Id-dawl u t-temperatura

31. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu adattati għall-ispeċi tat-test (ara Appendiċi 2).

Il-Frekwenza tal-Kejl u d-Determinazzjonijiet Analitiċi

32. Qabel jibda l-perjodu ta' qabel l-esponiment, għandu jiġi żgurat li s-sistema tat-twassil tas-sustanza kimika taħdem kif suppost. Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi kollha meħtieġa, inkluż għarfien suffiċjenti dwar l-istabilità kimika fis-sistema tat-test. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli regolari, kif ġej: preferibbilment, ir-rati tal-fluss tas-soluzzjoni ewlenija dilwenti u tossikanti għandhom jiġu vverifikati kuljum, iżda mill-inqas darbtejn fil-ġimgħa, u ma għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test innifsu jitkejlu fir-reċipjenti kollha fil-bidu tat-test u f'intervalli ta' ġimgħa wara dan.

33. Huwa rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti bejn ±20 % tal-konċentrazzjoni nominali, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla.

34. Il-kampjuni jistgħu jeħtieġu jiġu ffiltrati (eż. bl-użu ta' pori ta' μ0.45 μm) jew jiġu ċentrifugati. Jekk ikun hemm bżonn, imbagħad iċ-ċentrifugazzjoni hija l-proċedura rrakkomandata. Madankollu, jekk il-materjal tat-test ma jiġix adsorbit mill-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll.

35. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, it-temperatura, u l-pH għandhom jitkejlu fir-reċipjenti kollha tat-test tal-inqas darba fil-ġimgħa. L-ebusija u l-alkalinità totali għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed fl-ogħla konċentrazzjoni tal-anqas darba fil-ġimgħa. Idealment, it-temperatura għandha tiġi ssorveljata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wieħed tat-test.

Osservazzjonijiet

36. Għadd ta' risponsi ġenerali (eż. sopravivenza) u risponsi bijoloġiċi ewlenin (eż. il-livelli tal-vitelloġenina) jiġu vvalutati matul l-assaġġ jew fi tmiem l-assaġġ. Jeħtieġ li kuljum isir il-monitoraġġ kwantitattiv tal-fekonditá. Il-kejl u l-valutazzjoni ta' dawn il-punti ta' tmiem u l-utilità tagħhom huma deskritti hawn taħt.

Sopravivenza

37. Matul il-perjodu tat-test, il-ħut għandu jiġi eżaminat kuljum u kwalunkwe mortalità għandha tiġi rreġistrata u l-ħut mejjet għandu jitneħħa malajr kemm jista' jkun. Il-ħut mejjet m'għandux jiġi sostitwit la fir-reċipjent tal-kontroll u lanqas fir-reċipjent tat-trattament. Is-sess tal-ħut li jmut matul it-test għandu jiġi determinat permezz ta' evalwazzjoni makroskopika tal-gonadi.

▼M7

Imġiba u dehra

38. Għandha tittieħed nota ta' kwalunkwe mġiba abnormali (relatata mal-kontrolli); din tista' tinkludi sinjali ta' tossiċità ġenerali inklużi ipervent-ilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, telf tal-bilanċ u inattivitá jew tmigħ mhux tas-soltu. Barra minn hekk għandha tittieħed nota ta' anormalitajiet esterni (bħal emorraġija, skolorazzjoni). Dawn is-sinjali ta' tossiċità għandhom jiġu kkunsidrati bir-reqqa waqt l-interpretazzjoni tad-dejta peress li jistgħu jindikaw konċentrazzjonijiet li fihom il-bijomarkaturi ta' attività endokrinali ma jkunux affidabbli. Dawn l-osservazzjonijiet tal-imġiba jistgħu anke jipprovdu informazzjoni kwalitattiva biex jinkiseb tagħrif dwar rekwi-żiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-ħut. Pereżempju, fil-karpjuni buras, f'irġiel normali jew f'nisa b'karatteristiċi maskili ġiet osservata aggressività territorjali matul esponiment androġeniku; fiż-żebra, l-imġiba karatteristika ta' tgħammir u riproduzzjoni wara li jinxtegħel id-dawl tiddgħajjef jew tiġi mfixkla minn esponiment estroġeniku jew antiandroġeniku.

39. Billi xi aspetti tad-dehra (primarjament il-kulur) jistgħu jinbidlu malajr bit-tqandil, importanti li l-osservazzjonijiet kwalitattivi jsiru qabel ma l-annimali jitneħħew mis-sistema tat-test. L-esperjenza miksuba sa issa bil-karpjuni buras tissuġġerixxi li, għall-ewwel, xi sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi esterni li ġejjin: il-kulur tal-ġisem (ċar jew skur), mudelli ta' kolorazzjoni (il-preżenza ta' strixxi vertikali) u l-forma tal-ġisem (ir-ras u r-reġjun pettorali). Għalhekk, l-osservazzjonijiet dwar id-dehra fiżika tal-ħut għandhom isiru matul it-test, u fi tmiem l-istudju

Fekondità

40. L-osservazzjonijiet kwantitattivi ta' kuljum tar-riproduzzjoni għandhom jiġu rreġistrati fuq bażi rreplikata. Il-produzzjoni tal-bajd għandha tiġi rreġistrata bħala l-għadd ta' bajd/nisa li jibqgħu ħajjin/jum fuq bażi rreplikata. Il-bajd jitneħħa kuljum mill-kompartimenti tat-test. Is-sottostrati riproduttivi għandhom jitqiegħdu fil-kompartimenti tat-test għall-karpjun buras u għaż-żebra sabiex il-ħut ikun jista' jbid f'kundizzjonijiet normali. L-Appendiċi 4 jagħti aktar dettalji tas-sottostrati riproduttivi għaż-żebra (Appendiċi 4A) u għall-karpjun buras (Appendiċi 4B). Mhuwiex meqjus bħala neċessarju li jiġi pprovdut sottostrat riproduttiv għall-medaka.

Il-qtil bla tbatija tal-ħut

41. Fil-jum 21, jiġifieri fi tmiem l-esponiment, il-ħut għandu jiġi ewtanizzat b'ammonti xierqa ta' Trikaina (Trikaina metan sulfonat, Metakaina, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l ibbaferjat bi 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonat tas-sodju, CAS.144-55-8) biex titnaqqas l-irritazzjoni fil-membrana mukuża; imbagħad jittieħed kampjun tad-demm jew tat-tessut għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina, kif spjegat fis-sezzjoni tal-vitelloġenina.

Osservazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji

42. Ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (l-għadd ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjun buras maskili, il-proċessi papillari fil-medaka maskili). B'mod partikolari, sustanzi kimiċi li jkollhom ċerti modi ta' azzjoni jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fl-anni-mali tas-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal trenbolon, metiltestosteron u diidrotestosteron, jistgħu jwasslu sabiex il-karp-juni buras femminili jiżviluppaw tuberkuli tan-namra prominenti jew sabiex il-medaka femminili tiżviluppa proċessi papillari (11, 20, 21). Ġie rrapportat ukoll li l-agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-għadd tat-tuber-kuli tan-namra u d-daqs tal-kuxxinett tal-kozz dorsali f'irġiel adulti ta'

▼M7

karpjun buras (26, 27). Dawn l-osservazzjonijiet morfoloġiċi grossi jistgħu jipprovdu tagħrif kwalitattiv u kwantitattiv siewi biex jingħata tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-ħut. L-għadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjun buras u l-proċessi papillari fil-medaka jistgħu jiġu kkwantifikati b'mod direttjew b'mod aktar prattiku f'kampjuni ppreservati. Il-proċeduri rrakkomandati għall-evalwazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras u fil-medaka huma disponibbli mill-Appendiċi 5A u mill-Appendiċi 5B, rispettivament.

Vitelloġenina (VTG)

43. Id-demm jinġabar mill-arterja/vina kawdali permezz ta' tubulu kapillari mikroematokritiku eparinizzat, jew inkella permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa. Skont kemm hi kbira l-ħuta, il-volumi tad-demm li jistgħu jinġabru ġeneralment ivarjaw bejn 5 u 60 µl għal kull ħuta individwali għall-karpjuni buras u minn 5-15 µl għal kull ħuta individwali għaż-żebra. Il-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni, u tinħażen ma' inibituri tal-proteażi f'temperatura ta' – 80 °C, sakemm tiġi analizzata għall-vitelloġenina. Inkella, fil-medaka jintuża l-fwied, u fiż-żebra jista' jintuża l-omoġenat tar-ras/denb bħala sors ta' tessut għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina (Appendiċi 6). Il-kejl tal-VTG għandu jkun imsejjes fuq metodu ELISA omologu vvalidat, bl-użu ta' standard omologu tal-VTG u antikorpi omologi. Huwa rrakkomandat li jintuża metodu li jkun kapaċi jiskopri livelli ta' VTG baxxi daqs ftit ng/ml fil-plażma (jew ng/mg fit-tessut), li huwa l-livell ta' sfond f'ħut maskili li ma jkunx ġie espost.

44. Il-kontroll tal-kwalità tal-analiżi tal-vitelloġenina jintlaħaq permezz tal-użu ta' standards, bjanki u mill-inqas analiżijiet duplikati. Għal kull metodu ELISA, għandu jsir test għall-effett matriċi (effett ta' dilwizzjoni ta' kampjun) biex jiġi determinat il-fattur minimu tad-dilwizzjoni tal-kampjun. Kull platt ELISA li jintuża għall-assaġġi tal-VTG għandu jinkludi l-kampjuni tal-kontroll tal-kwalità li ġejjin: mill-inqas 6 standards ta' kalibrazzjoni li jkopru l-firxa ta' konċentrazzjonijiet mistennija tal-vitelloġenina u mill-inqas bjank tal-assaġġ vinkolanti mhux speċifiku wieħed (analiżi duplikata). L-assorbiment ta' dawn il-bjanki għandu jkun ta' anqas minn 5 % tal-assorbiment standard massimu ta' kalibrazzjoni. Minn kull kampjun ta' dilwizzjoni jiġu analizzati tal-anqas żewġ alikwoti (well-duplicates). Well-duplicates li jvarjaw b'aktar minn 20 % għandhom jerġgħu jiġu analizzati.

45. Il-koeffiċjent tal-korrelazzjoni (R^2) għall-kurvi ta' kalibrazzjoni għandu jkun ta' aktar minn 0.99. Madankollu, korrelazzjoni għolja mhijiex biżżejjed biex tiggarantixxi tbassir adegwat tal-konċentrazzjoni fil-meded kollha. Minbarra li jkun hemm korrelazzjoni għolja biżżejjed għall-kurva ta' kalibrazzjoni, il-konċentrazzjoni ta' kull standard, kif ikkalkolata mill-kurva ta' kalibrazzjoni, dejjem għandha taqa' bejn 70 u 120 % tal-konċentrazzjoni nominali tiegħu. Jekk il-konċentrazzjonijiet nominali jxaqilbu lil hinn mil-linja ta' rigressjoni tal-kalibrazzjoni (eż. f'konċentrazzjonijiet inqas), jista' jkun hemm bżonn li l-kurva ta' kalibrazzjoni tinqasam f'meded baxxi u għoljin jew li jintuża mudell nonlineari li jaqbel b'mod adegwat mad-dejta dwar l-assorbiment. Jekk il-kurva tinqasam, iż-żewġ segmenti tal-linja għandu jkollhom $R^2 > 0.99$.

46. Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku, u l-limitu ta' kwantitazzjoni (LOQ) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku mmoltiplikata bl-inqas fattur ta' dilwizzjoni.

47. F'kull jum li fih isiru l-assaġġi tal-vitelloġenina għandu jiġi analizzat kampjun ta' fortifikazzjoni permezz ta' standard ta' referenza interassaġġi (Appendiċi 7). Il-proporzjon tal-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla jiġi rrapportat flimkien mar-riżultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

Evalwazzjoni tal-istopatoloġija gonadali

48. Jista' jkun meħtieġ li ssir istopatoloġija gonadali mill-awtoritajiet regolatorji sabiex ikunu jistgħu jistudjaw l-organu fil-mira fuq l-assi tal-HPG wara l-esponiment kimiku. F'dan ir-rigward, il-gonadi jitqiegħdu sħaħ jew dissezzjonati. Meta tkun meħtieġa istopatoloġija, għandhom jiġu mfittxija risponsi endokrinali speċifiċi fuq il-gonadi fil-valutazzjoni tal-attività endokrinali tas-sustanza kimika tat-test. Dawn ir-risponsi dijanjostiċi essenzjalment jinkludu

▼M7

l-preżenza ta' ooċiti testikulari, iperplażja taċ-ċellula Leydig, tnaqqis fil-formazzjoni tal-isfar tal-bajd, żieda fl-ispermatogonija u iperplażja perifollikulari. Leżjonijiet gonadali oħrajn, bħal atreżja tal-ooċiti, diġenerazzjoni testikulari u bidliet fl-istadji, jista' jkollhom diversi kawżi. Id-dokument ta' Gwida dwar l-istopatoloġija gonadali tal-ħut jispeċifika l-proċeduri li jintużaw fid-dissezzjoni, il-fissazzjoni, is-sezzjonar u l-evalwazzjoni istopatoloġika tal-gonadi (22).

DEJTA U RAPPORTAR

Valutazzjoni tar-Risposti tal-Bijomarkatur permezz ta' Analiżi tal-Varjanza (ANOVA)

49. Biex tiġi identifikata l-attività endokrinali potenzjali ta' sustanza kimika, ir-risposti jitqabblu bejn il-gruppi ta' trattament u ta' kontroll permezz ta' analiżi tal-varjanza (ANOVA). Meta jintuża kontroll tas-solvent, għandu jsir test statistiku xieraq bejn il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u l-kontroll tas-solvent għal kull punt ta' tmiem. Gwida dwar kif tittratta d-dejta dwar il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u tas-solvent fl-analiżi statistika sussegwenti tista' tinstab fl-OECD, 2006c (28). Id-dejta kollha dwar ir-rispons bijoloġiku għandha tiġi analizzata u rrapportata separatament skont is-sess. Jekk ma jintlaħqux is-suppożizzjonijiet meħtieġa għall-metodi parametriċi — distribuzzjoni mhux normali (eż. it-test ta' Shapiro-Wilk) jew varjanza eteroġena (it-test ta' Bartlett jew it-test ta' Levene), għandha tiġi kkunsidrata l-possibilità li d-dejta tiġi konvertita f'varjanzi omoġenizzati qabel ma ssir l-ANOVA, jew qabel ma ssir ANOVA ponderata. It-test ta' Dunnett (parametriku) fuq tqabbiliet multipli bejn pari jew it-test ta' Mann-Whitney b'aġġustament Bonferroni (mhux parametriku) jista' jintuża għal rispons mhux monotonu għad-doża. Jekk ir-rispons għad-doża ikun kważi monotonu jistgħu jintużaw testijiet statistiċi oħra (eż. it-test ta' Jonckheere-Terpstra jew it-test ta' Williams). Fl-Appendiċi 8 ġiet ipprovduta flowchart statistika biex tgħin fid-deċiżjoni dwar l-aktar test statistiku xieraq li għandu jintuża. Tagħrif addizzjonali jista' jinkiseb ukoll mid-Dokument tal-OECD dwar Approċċi Attwali lejn l-Analiżi Statistika ta' Dejta dwar l-Ekotossiċità (28).

Rappurtar tar-riżultati tat-test

50. Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

Il-faċilità tal-ittestjar:

— Il-persunal responsabbli u r-responsabilitajiet tal-istudju tiegħu,

— Kull laboratorju għandu jkun wera profiċjenza fl-użu ta' firxa ta' sustanzi kimiċi rappreżentattivi

Sustanza kimika tat-test:

— Karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

— In-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti

— Il-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tat-test

— Informazzjoni dwar l-istabbiltà u l-bijodegradabilità

Solvent:

— Il-karatterizzazzjoni tas-solvent (in-natura, il-konċentrazzjoni użata)

— Ġustifikazzjoni tal-għażla tas-solvent (jekk ma jkunx ilma)

▼M7

Annimali tat-test:

— L-ispeċi u r-razza

— Il-fornitur u l-faċilità speċifika tal-fornitur,

— L-età tal-ħut fil-bidu tat-test u l-istatus ta' riproduzzjoni

— Dettalji tal-proċedura ta' akklimatizzazzjoni tal-annimali

— Il-piż tal-ġisem tal-ħut fil-bidu tal-esponiment (minn sottokampjun tal-istokk tal-ħut)

Kundizzjonijiet tat-test:

— Il-proċedura tat-test użata (it-tip tat-test, ir-rata tat-tagħbija, id-densità tal-istokkjar, eċċ.);

— Il-metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u r-rata tal-fluss;

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test imkejla kull ġimgħa u l-metodu analitiku użat, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard fir-reċipjenti tat-test u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni vera;

— Il-karatteristiċi tal-ilma tad-dilwizzjoni (inkluż il-pH, l-ebusija, l-alkalinità, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli ta' klorin residwu, il-karbonju organiku totali, is-solidi sospiżi u kwalunkwe kejl ieħor li jkun sar)

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test: il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;

— Informazzjoni ddettaljata dwar it-tmigħ (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont li ngħata u l-frekwenza u analiżijiet għal kontaminanti relevanti jekk disponibbli (eż. PCBs, PAHs u pestiċidi organoklorurati).

Riżultati

— Evidenza li l-kontrolli jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Dejta dwar il-mortalitajiet li seħħu fi kwalunkwe konċentrazzjoni tat-test u fil-kontroll;

— Tekniki analitiċi statistiċi użati, it-trattament tad-dejta u ġustifikazzjoni tat-tekniki użati;

— Dejta dwar osservazzjonijiet bijoloġiċi ta' morfoloġija grossa, inklużi l-karatteristiċi sesswali sekondarji, il-produzzjoni tal-bajd u l-vitelloġenina;

— Riżultati tal-analiżi tad-dejta, idealment f'forma tabulari u grafika;

— Inċidenza ta' kwalunkwe reazzjoni mhux tas-soltu mill-ħut u kwalunkwe effett viżibbli kkawżat mis-sustanza kimika tat-test

▼M7

GWIDA GĦALL-INTERPRETAZZJONI U L-AĊĊETTAZZJONI TAR-RIŻULTATI TAT-TEST

51. Din is-sezzjoni fiha ftit kunsiderazzjonijiet li għandhom jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test għad-diversi punti ta' tmiem imkejla. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'kawtela fejn is-sustanza kimika tat-test tidher li tkun qed tikkawża tossiċità evidenti jew li qed ikollha impatt fuq il-kundizzjoni ġenerali tal-annimal tat-test.

52. Meta tkun qed tiġi stabbilita l-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, għandha tingħata attenzjoni biex ma tinqabiżx il-konċentrazzjoni massima tollerata biex tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Importanti li tal-anqas ikun hemm trattament wieħed li fih ma jkunx hemm sinjali ta' effetti tossiċi. Sinjali ta' mard u sinjali ta' effetti tossiċi għandhom jiġu vvalutati u rrapportati f'ċertu dettall. Pereżempju, huwa possibbli li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata wkoll mit-tossiċità ġenerali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità. Madankollu, l-interpretazzjoni tal-effetti tista' tiġi sostnuta minn livelli oħra ta' kura li ma jitfixklux mit-tossiċità sistemika.

53. Hemm xi aspetti li wieħed irid iqis għall-aċċettazzjoni tar-riżultati tat-test. Bħala gwida, il-livelli tal-VTG fi gruppi ta' kontroll tal-irġiel u tan-nisa għandhom ikunu distinti u separati b'madwar tliet ordnijiet ta' kobor fil-karpjun buras u fiż-żebra, u b'madwar ordni uniku ta' kobor għall-medaka. Eżempji tal-medda ta' valuri li wieħed jista' jiltaqa' magħhom fil-gruppi ta' kontroll u ta' kura huma disponibbli fir-rapporti ta' validazzjoni (1, 2, 3, 4). Valuri għolja tal-VTG fl-irġiel ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-rispons tal-assaġġ u l-kapaċità tiegħu li jiskopri agonisti dgħajfa tal-estroġenu. Valuri baxxi tal-VTG fin-nisa ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-risponsività tal-assaġġ u l-ħila tiegħu li jiskopri inibituri tal-aromataži u antagonisti tal-estroġenu. Biex tinbena dik il-gwida ntużaw l-istudji ta' validazzjoni.

54. F'dak li għandu x'jaqsam mal-kwantifikazzjoni tal-produzzjoni tal-bajd, dan huwa soġġett għal varjazzjonijiet importanti [il-koeffiċjent tal-varjazzjoni (CV) jista' jvarja minn 20 sa 60 %] li jaffettwaw il-kapaċità tal-assaġġ li jidentifika tnaqqis sinifikanti fil-produzzjoni tal-bajd iżgħar minn 70 %, hekk kif is-CV javviċina 50 % jew aktar. Meta s-CV ikun limitat għal valuri aktar baxxi (madwar 20-30 %), l-assaġġ ikollu qawwa aċċettabbli (80 %) sabiex jidentifika tnaqqis ta' 40-50 % fil-produzzjoni tal-bajd. Id-disinn tat-test użat għall-karpjun buras, inklużi erba' repliki għal kull livell tat-trattament, għandu jippermetti aktar qawwa lill-punt tat-tmiem tal-fekondità, imqabbel ma' disinn tat-test b'2 repliki biss.

55. Jekk laboratorju ma jkunx għamel l-assaġġ qabel jew jekk ikunu saru bidliet sostanzjali (eż. bidla fir-razza tal-ħut jew tal-fornitur) huwa rrakkomandat li jsir studju tal-profiċjenza teknika. Huwa rrakkomandat li jintużaw sustanzi kimiċi li jkopru firxa ta' modi ta' azzjoni jew impatti fuq għadd tal-punti ta' tmiem tat-test. Fil-prattika, kull laboratorju huwa mħeġġeġ jibni dejta storika ta' kontroll proprja għall-irġiel u għan-nisa u biex jagħmel kimika ta' kontroll pożittiv għall-attività estroġenika (eż. 17β-estradjol f'doża ta' 100 ng/l, jew agonist dgħajjef magħruf) li twassal għal żieda fil-VTG fil-ħut maskili, kimika ta' kontroll pożittiv għall-inibizzjoni tal-aromataži (eż. fadrozole jew prochloraz f'doża ta' 300 µg/l) li twassal għal tnaqqis fil-VTG fil-ħut nisa, u kimika ta' kontroll pożittiv għall-attività androġenika (eż. 17β-trenbolon f'doża ta' 5 µg/l) li twassal għall-induzzjoni ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras u l-medaka femminili. Din id-dejta kollha tista' titqabbel ma' dejta disponibbli mill-istudji ta' validazzjoni (1, 2, 3) biex tiġi żgurata l-profiċjenza tal-laboratorju.

56. B'mod ġenerali, il-kejl tal-vitelloġenina għandu jitqies pożittiv jekk ikun hemm żieda statistikament sinifikanti fil-VTG fl-irġiel ($p < 0,05$), jew tnaqqis statistikament sinifikanti fin-nisa ($p < 0,05$) tal-anqas fl-ogħla doża ttestjata meta mqabbla mal-grupp ta' kontroll, u fin-nuqqas ta' sinjali ta' tossiċità ġenerali. Riżultat pożittiv jikseb sostenn ikbar meta jintwera li hemm relazzjoni bijoloġikament plawżibbli bejn id-doża u l-kurva tar-rispons. Kif intqal

▼M7

qabel, it-tnaqqis fil-vitelloġenina jaf ma jkollux oriġini kompletament endokrinali; madankollu, ġeneralment riżultat pożittiv għandu jiġi interpretat bħala evidenza ta' attività endokrinali *in vivo*, u normalment għandu jagħti bidu għal azzjonijiet għal kjarifika ulterjuri.

57. Tista' tkun meħtieġa evalwazzjoni tal-istopatoloġija gonadali mill-awtoritajiet regolatorji sabiex tiġi ddeterminata l-idoneità riproduttiva tal-annimali tat-test u sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni tal-piż tal-evidenza tar-riżultati tat-test. L-eżekuzzjoni ta' istopatoloġija gonadali tista' ma tkunx meħtieġa f'każijiet fejn il-VTG jew il-karatteristiċi sesswali sekondarji jkunu pożittivi (jiġifieri żieda jew tnaqqis fil-VTG jew induzzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji).

TAGĦRIF

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.

(7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 531-539.

(17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

(23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(27) Martinovic D., *et al*. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

(30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼**M7**

Appendiċi 1

ABBREVJAZZJONIJIET U DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika: sustanza jew taħlita

CV: koeffiċjent tal-varjazzjoni

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enżimatiku

Assi HPG: assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali

Rata ta' tagħbija: il-piż imxarrab tal-ħut skont il-volum ta' ilma.

MTC: Konċentrazzjoni Massima Tollerata, li tirrapreżenta madwar 10 % tal-LC_{50}

Densità tal-istokkjar: l-għadd ta' ħut għal kull volum ta' ilma.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qed tiġi ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

VTG: vitelloġenina hija prekursur tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment iseħħ f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

▼M7

Appendiċi 2

KUNDIZZJONIJIET SPERIMENTALI GĦALL-ASSAĠĠ TAL-ISKRINJAR TAS-SISTEMA ENDOKRINALI TAL-ĦUT

1. Speċijiet rakkomandati	Karpjun buras (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Żebra (*Danio rerio*)
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu
3. Temperatura tal-ilma	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')
5. Intensità tad-dawl	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)
6. Fotoperjodu (it-tranżizzjonijiet bejn tlugħ ix-xemx / inżul ix-xemx huma fakultattivi, madanakollu ma jitqisux neċessarji)	16-il siegħa ta' dawl, 8 sigħat ta' dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 sigħat ta' dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 sigħat ta' dlam
7. Rata ta' tagħbija	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l
8. Id-daqs tal-kompartiment tal-ittestjar	10 l (minimu)	2 l (minimu)	5 l (minimu)
9. Volum tas-soluzzjoni tat-test	8 l (minimu)	1,5 l (minimu)	4 l (minimu)
10. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Minimu ta' 6 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum
11. L-età tal-organiżmi tat-test	Ara l-paragrafu 21	Ara l-paragrafu 21	Ara l-paragrafu 21
12. Piż imxarrab approssimattiv tal-ħut adulti (g)	Nisa: 1,5 ± 20 % Irġiel: 2,5 ± 20 %	Nisa: 0,35 ± 20 % Irġiel: 0,35 ± 20 %	Nisa: 0,65 ± 20 % Irġiel: 0,4 ± 20 %
13. Nru ta' ħut f'kull reċipjent tat-test	6 (2 irġiel u 4 nisa)	6 (3 irġiel u 3 nisa)	10 (5 irġiel u 5 nisa)
14. Nru. ta' trattamenti	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)
15. Nru ta' reċipjenti għal kull trattament	Minimu ta' 4	Minimu ta' 4	Minimu ta' 2
16. Nru. ta' ħut għal kull konċentrazzjoni tat-test	16-il mara adulta u 8 irġiel (4 nisa u 2 irġiel f'kull reċipjent irreplikat)	12-il mara adulta u 12 irġiel (3 nisa u 3 irġiel f'kull reċipjent irreplikat)	10-il mara adulta u 10 irġiel (5 nisa u 5 irġiel f'kull reċipjent irreplikat)
17. Reġim ta' tmigħ	Gambli adulti jew nauplii tal-ilma mielaħ ħajjin jew iffriżati darbtejn jew tliet darbiet kuljum (*ad libitum*), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn ta' hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielaħ darbtejn jew tliet darbiet kuljum (*ad libitum*), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn ta' hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielaħ darbtejn jew tliet darbiet kuljum (*ad libitum*), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn ta' hawn fuq

▼M7

18. Ossiġenazzjoni	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja
19. Ilma tad-dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif
20. Perjodu ta' preespożizzjoni	perjodu rakkomandat ta' 7-14-il jum	perjodu rakkomandat ta' 7-14-il jum	perjodu rakkomandat ta' 7-14-il jum
21. Id-durata tal-esponiment kimiku	21 jum	21 jum	21 jum
22. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	— sopravivenza — imġiba — fekondità — karatteristiċi sesswali sekondarji — VTG — istopatoloġija gonadali b'mod fakultattiv	— sopravivenza — imġiba — fekondità — karatteristiċi sesswali sekondarji — VTG — istopatoloġija gonadali b'mod fakultattiv	— sopravivenza — imġiba — fekondità — VTG — istopatoloġija gonadali b'mod fakultattiv
23. Aċċettabilità tat-test	Ossiġenu dissolt ≥ 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 25 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossiġenu dissolt ≥ 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 25 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossiġenu dissolt ≥ 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 26 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.

▼**M7**

Appendiċi 3

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI

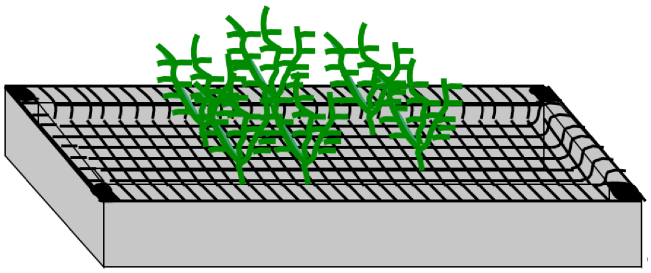
KOMPONENT	KONĊENTRAZZJONIJIET
Materja partikolata	< 20mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Kloru residwu	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

▼M7

Appendiċi 4A

SOTTOSTRAT TAL-BIDIEN GĦAŻ-ŻEBRA

Trej għall-bidien: dixx kollu tal-ħġieġ, pereżempju 22 × 15 × 5,5 cm (l x w x d), kopert b'kannizzata tal-azzar inossidabbli li tista' titneħħa (xibka wiesgħa 2mm). Il-kannizzata għandha tgħatti l-bokka tad-dixx f'livell taħt ix-xifer.



Is-sottostrat tal-bidien għandu jitpoġġa fuq il-kannizzata. Għandu jipprovdi struttura biex il-ħut ikunu jistgħu jidħlu fiha. Pereżempju, pjanti artifiċjali tal-akkwarji magħmulin minn materjal aħdar tal-plastik huma tajbin (NB: għandu jitqies l-adsorbiment possibbli tal-kimika tat-test fil-materjal tal-plastik). Il-materjal tal-plastik għandu jitbattal f'volum suffiċjenti ta' ilma sħun għal tul ta' żmien suffiċjenti biex jiġi żgurat li ma tintreħa ebda sustanza kimika fl-ilma tat-test. Meta jkun qed jintuża materjal tal-ħġieġ għandu jiġi żgurat li l-ħut la jindarab u lanqas ma jkun iffullat matul l-azzjonijiet vigoruż tiegħu.

Id-distanza bejn it-trej u l-panewwi tal-ħġieġ għandha tkun ta' mill-inqas 3 cm biex jiġi żgurat li l-bidien ma jsirx barra mit-trej. Il-bajd li jitbied fuq it-trej jaqa' minn ġol-kannizzata u jista' jiġi kampjunat tliet kwarti sa siegħa wara l-bidu tal-illuminazzjoni. Il-bajd trasparenti ma jeħilx u jista' jingħadd faċilment permezz tal-użu ta' dawl transversali. Meta jkunu qed jintużaw ħames nisa f'kull reċipjent, sa 20 bajda f'ġurnata jistgħu jitqiesu bħala kwantità baxxa, sa 100 bħala medja u aktar minn 100 bħala kwantità għolja. It-trej tal-bidien għandu jitneħħa, il-bajd għandu jinġabar u t-trej tal-bidien għandu jerġa' jiddaħħal fir-reċipjent tat-test, jew l-aktar tard possibbli filgħaxija jew kmieni ħafna filgħodu. It-trej tal-bidien m'għandux jitħalla aktar minn siegħa biex jerġa' jiddaħħal peress li nkella s-sinjal tas-sottostrat tal-bidien jista' jinduċi tgħammir individwali u bidien fi żmien mhux tas-soltu. Jekk sitwazzjoni tkun teħtieġ li t-trej tal-bidien jiddaħħal aktar tard, dan għandu jsir mill-inqas 9 sigħat wara l-bidu tal-illuminazzjoni. F'dan il-ħin tard fil-ġurnata, il-bidien ma jibqax jiġi indott iktar. 7Appendiċi 4B

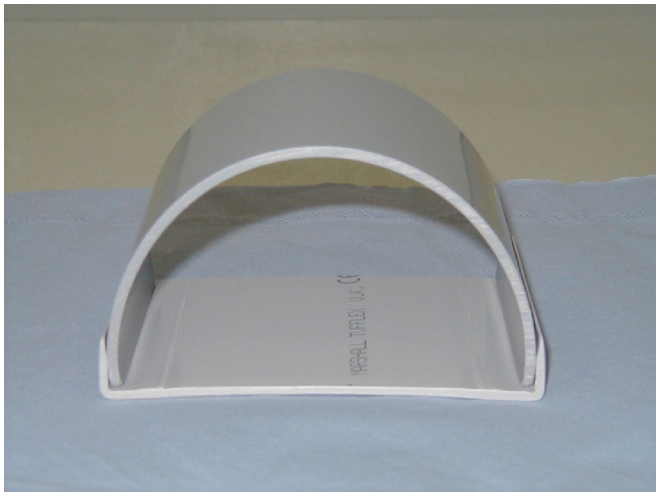
▼M7

Appendiċi 4 B

SOTTOSTRAT TAL-BIDIEN GĦALL-KARPJUN BURAS

F'kull kompartiment tat-test jitqiegħdu żewġ jew tliet madumiet jew trejs riproduttivi kkombinati tal-plastik/ċeramika/ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli (eż. kanal semiċirkulari griż twil 80mm imqiegħed fuq trej bix-xoffa twil 130mm) (ara l-istampa). Intwera li madum taċ-ċeramika jew tal-PVC akklimatizzati sew joqgħod bħala sottostrat tal-bidien (Thorpe *et al*, 2007).

Huwa rrakkomandat li l-madum jinbarax biex tittejjeb l-adeżjoni. It-trej għandu jiġi skrinjat ukoll biex il-ħut jitwaqqaf milli jaċċessa l-bajd li jkun waqa' sakemm ma tkunx intweriet effiċjenza tas-sottostrat tal-bidien użat fl-adeżjoni tal-bajd.



Il-bażi hija ddisinjata biex iżżomm kwalunkwe bajd li ma jeħilx mal-wiċċ tal-madum u għalhekk jaqa' f'qiegħ it-tank (jew dak il-bajd li jitbied direttament fuq il-bażi ċatta tal-plastik). Qabel jintużaw, is-sottostrati tal-bidien għandhom jitbattlu lkoll għal mhux inqas minn 12-il siegħa, f'ilma tad-dilwizzjoni.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M7

Appendiċi 5 A

VALUTAZZJONI TAL-KARATTERISTIĊI SESSWALI SEKONDARJI FIL-KARPJUN BURAS GĦAD-DETEZZJONI TA' ĊERTI SUSTANZI KIMIĊI ATTIVI FIS-SISTEMA ENDOKRINALI

Harsa ġenerali

Karatteristiċi potenzjalment importanti fid-dehra fiżika fil-karpjuni buras adulti fl-ittestjar għal sustanzi li jfixklu s-sistema endokrinali jinkludu l-kulur tal-ġisem (jiġifieri ċar/skur), il-mudelli ta' kolorazzjoni (jiġifieri l-preżenza jew in-nuqqas ta' faxex vertikali), il-forma tal-ġisem (jiġifieri l-forma tar-ras u tar-reġjun pettorali, id-distensjoni tal-addome), u l-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (jiġifieri l-għadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra, id-daqs tal-kuxxinett dorsali u tal-ovipożitur).

It-tuberkuli tan-namra jinsabu fuq ir-ras (il-kuxxinett dorsali) tal-karpjuni buras irġiel riproduttivament-attivi, u ġeneralment ikunu rranġati f'mudell bilateralment simmetriku (Jensen *et al.* 2001). In-nisa tal-kontroll u l-irġiel u n-nisa żgħar ma juru l-ebda żvilupp ta' tuberkuli (Jensen *et al.* 2001). Jista' jkun hemm sa tmien tuberkuli individwali madwar l-għajnejn u bejn l-imnifsejn tal-irġiel. L-akbar għadd ta' tuberkuli u l-akbar tuberkuli jinsabu f'żewġ linji paralleli eżatt taħt l-imnieħer u fuq il-ħalq. F'ħafna ħut hemm gruppi ta' tuberkuli taħt ix-xedaq t'isfel; dawk l-eqreb tal-ħalq ġeneralment jinsabu bħala par uniku, filwaqt li l-aktar sett ventrali jista' jkun magħmul minn massimu ta' erba' tuberkuli. L-għadd attwali ta' tuberkuli rarament ikun ta' aktar minn 30 (medda, 18-28; Jensen *et al*. 2001). It-tuberkuli predominanti (f'termini ta' għadd) huma preżenti bħala struttura waħda, relattivament tonda, b'għoli kważi ekwivalenti għar-raġġ. Ħafna mill-irġiel attivi fir-riproduzzjoni għandhom ukoll, tal-anqas ftit, tuberkuli mkabbrin u evidenti li m'humiex distingwibbli bħala strutturi individwali.

Xi tipi ta' sustanzi kimiċi li jfixklu s-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' ċerti karatteristiċi sesswali sekondarji fis-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal 17α-metiltestosteron jew 17β-trenbolon, jistgħu jikkawżaw l-iżvilupp ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras nisa (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), filwaqt li agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-għadd jew id-daqs tat-tuberkuli tan-namra fl-irġiel (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al*. 2000).

Hawn taħt hawn deskrizzjoni tal-karatterizzazzjoni tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras fuq il-bażi ta' proċeduri użati fil-laboratorju tal-Aġenzija għall-Ħarsien tal-Ambjent f'Duluth, MN, l-Istati Uniti. Prodotti u/jew tagħmir speċifiċi jistgħu jiġu sostitwiti ma' materjali paragunabbli disponibbli.

L-osservazzjoni ssir l-aħjar bl-użu ta' lenti illuminata jew mikroskopju 3X illuminat għad-dissezzjonijiet. Ħares lejn il-ħuta mil-lat dorsali u anterjuri 'l quddiem (ir-ras lejn min ikun qed josserva).

— Poġġi l-ħuta f'dixx Petri żgħir (eż. b'dijametru ta' 100 mm), anterjuri 'l quddiem, u ventrali 'l isfel. Iffoka l-viewfinder biex tippermetti l-identifikazzjoni tat-tuberkuli. Bil-galbu u bil-mod dawwar il-ħuta minn naħa għall-oħra biex tidentifika ż-żoni fejn ikun hemm it-tuberkuli. Għodd u kklassifika t-tuberkuli.

— Irripeti l-osservazzjoni fuq il-lat ventrali tar-ras billi tpoġġi l-lat anterjuri dorsali tal-ħuta 'l quddiem fid-dixx Petri.

— L-osservazzjonijiet għandhom jitlestew fi żmien 2 minuti għal kull ħuta.

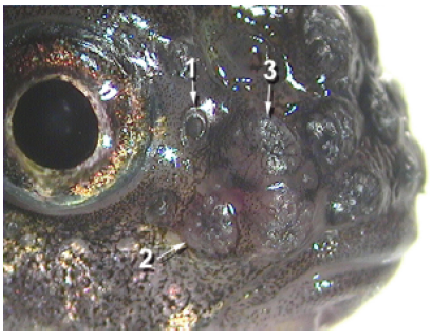
▼M7

L-Għadd u l-Klassifikazzjoni tat-Tuberkuli

Ġew identifikati sitt żoni speċifiċi għall-valutazzjoni tal-preżenza u tal-iżvilupp tat-tuberkuli f'karpjuni buras adulti. Ġie żviluppat mudell biex jiġu mmappjati l-post u l-kwantità tat-tuberkuli preżenti (ara fl-aħħar ta' dan l-Appendiċi). L-għadd ta' tuberkuli jiġi rreġistrat u d-daqs tagħhom jista' jiġi kklassifikat b'mod kwantitattiv bħala: 0- xejn, 1-preżenti, 2-imkabbrin u 3-evidenti għal kull organiżmu (Fig. 1).

Klassifikazzjoni ta' 0- ebda tuberkulu preżenti. Klassifikazzjoni ta' 1-preżenti, hija identifikata bħala kwalunkwe tuberkulu li jkollu punt uniku li l-għoli tiegħu ikun kważi ekwivalenti għar-raġġ tiegħu. Klassifikazzjoni ta' 2-mkabbrin, hija identifikata bħala tessut li fid-dehra jixbah asterisk, li ġeneralment ikollu bażi radjali kbira bi xquq jew kanali ħerġin miċ-ċentru. Ħafna drabi l-għoli tat-tuberkuli ikun aktar ippizzjat iżda xi drabi jista' jkun naqra fit-tond. Klassifikazzjoni ta' 3-evidenti, ġeneralment ikun pjuttost kbir u ttundjat bi struttura inqas definita. Xi drabi dawn it-tuberkuli ikunu qrib xulxin u jiffurmaw massa waħda tul żona individwali jew taħlita ta' żoni (B, C u D, deskritti hawn taħt). Il-kolorazzjoni u d-disinn huma simili għall-klassifikazzjoni ta' 2 iżda xi drabi ikunu pjuttost indiskriminati. Ġeneralment, l-użu ta' din is-sistema ta' klassifikazzjoni jwassal għal punteġġi globali ta' tuberkuli ta' < 50 f'raġel normali tal-kontroll b'għadd ta' 18 sa 20 tuberkulu (Jensen *et al.* 2001).

Figura 1



F'ċertu ħut, l-għadd proprju ta' tuberkuli jista' jkun akbar mill-kaxxi tal-mudelli għal żona partikolari ta' klassifikazzjoni. F'dan il-każ, in-numri addizzjonali ta' klassifikazzjoni jistgħu jiġu mmarkati ġewwa, fuq il-lemin jew fuq ix-xellug tal-kaxxa. Għalhekk, il-mudell ma għandux bżonn juri simmetrija. Teknika addizzjonali għall-immappjar tat-tuberkuli f'pari jew mehmużin vertikalment tul il-pjan orizzontali tal-ħalq tista' ssir billi f'kaxxa waħda jitniżżlu żewġ punti ta' klassifikazzjoni tat-tuberkuli.

Reġjuni ta' mmappjar:

A - Tuberkuli li jinsabu madwar l-għajnejn. Jiġu mmappjati mil-lat dorsali għal dak ventrali madwar ir-rimm anterjuri tal-għajn. Komunement dawn ikunu f'multipli f'irġiel maturi ta' kontroll, ma jkunux preżenti f'nisa ta' kontroll, ikunu ġeneralment f'par (wieħed ħdejn kull għajn) jew waħedhom f'nisa esposti għall-androġeni.

B - Tuberkuli li jinsabu bejn l-imnieħer, (pori sensorjali fil-kanal). Normalment dawn ikunu f'pari f'irġiel tal-kontroll f'livelli aktar elevati (2- imkabbrin jew 3-evidenti) ta' żvilupp. Mhux preżenti f'nisa tal-kontroll b'xi okkorrenza u żvilupp f'nisa esposti għall-androġeni.

C - Tuberkuli li jinsabu eżatt wara l-imnieħer, paralleli mal-ħalq. Ġeneralment dawn ikunu mkabbrin jew evidenti f'irġiel maturi tal-kontroll. Preżenti jew imkabbrin f'irġiel anqas żviluppati jew f'nisa ttrattati bl-androġeni.

▼**M7**

D - Tuberkuli li jinsabu paralleli tul il-linja tal-ħalq. Ġeneralment ikklassifikatati bħala żviluppati f'irġiel tal-kontroll. Assenti f'nisa tal-kontroll iżda preżenti f'nisa esposti għall-androġeni.

E - Tuberkuli li jinsabu fuq ix-xedaq t'isfel, qrib il-ħalq, normalment ikunu żgħar u ġeneralment ikunu f'pari. Ivarjaw f'irġiel tal-kontroll jew ittrattati, u f'nisa ttrattati.

F - Tuberkuli li jinsabu fil-lat ventrali għal E. Normalment ikunu żgħar u f'pari. Preżenti f'irġiel tal-kontroll u f'nisa esposti għall-androġeni.

REFERENZI

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Mudell għat-Tuberkuli:

ID_____

Data_____

Punteġġ Totali _____

Klassifikazzjoni Numerika

1-preżenti

2-imkabbar

3-pronunzjat

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

Appendiċi 5 B

VALUTAZZJONI TAL-KARATTERISTIĊI SESSWALI SEKONDARJI FIL-MEDAKA GĦAD-DETEZZJONI TA' ĊERTI SUSTANZI KIMIĊI ATTIVI FIS-SISTEMA ENDOKRINALI

Hawn taħt tingħata deskrizzjoni tal-kejl tal-proċessi papillari ([1]), li huma l-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-medaka (*Oryzias latipes*).

(1) Wara l-qtugħ tal-fwied (Appendiċi 6), il-karkassa titqiegħed f'tubu koniku li jkun fih madwar 10 ml ta' 10 % formalina newtrali bbaferjata ('il fuq: ir-ras, 'l isfel: id-denb). Jekk il-gonada titqiegħed f'soluzzjoni oħra li mhijiex 10 % formalina newtrali bbaferjata, agħmel qatgħa trasversali tul il-karkassa bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus permezz ta' xafra, u ara li ma tagħmilx ħsara lill-gonopori u l-gonada stess (Fig.3). Poġġi n-naħa kranjali tal-ġisem tal-ħuta fis-soluzzjoni fissattiva biex tippreserva l-gonada, u n-naħa tad-denb tal-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata kif deskritta hawn fuq.

(2) Wara li tpoġġi l-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata, aqbad ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali b'pinzetta u itwih għal madwar 30 sekonda biex iżomm il-pinna anali miftuħa. Meta tkun qed taqbad il-pinna anali b'pinzetta, aqbad ftit xewk tal-pinen fir-reġjun anterjuri bil-galbu biex ma tobroxx il-proċessi papillari.

(3) Wara li żżomm il-pinna anali miftuħa għal madwar 30 sekonda, aħżen ġisem il-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata f'temperatura ambjentali sakemm jitkejlu l-proċessi papillari (il-kejl għandu jsir wara ffissar għal mhux anqas minn 24 siegħa).

Kejl

(1) Wara l-iffissar tal-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata għal mill-inqas 24 siegħa, iġbor il-karkassa tal-ħuta mit-tubu koniku u imsaħ il-formalina fuq il-karta tal-filtru (jew b'xugaman tal-karta).

(2) Poġġi l-ħut bl-addome 'l fuq. Imbagħad aqta' l-pinna anali b'imqass żgħar tad-dissezzjoni bil-galbu (idealment għandek taqta' l-pinna anali b'ammont żgħir ta' pteriġjofora).

(3) Aqbad ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali li tkun inqatgħet b'pinzetta u poġġiha fuq lastra tal-ħġieġ b'diversi qtar tal-ilma. Imbagħad agħtti l-pinna anali b'għatu tal-ħġieġ. Ara li meta tkun qed taqbad il-pinna anali bil-pinzetta ma tobroxx il-proċessi papillari.

(4) Għodd in-numru tal-joint plate bi proċessi papillari permezz ta' kontatur taħt mikroskopju bijoloġiku (mikroskopju wieqaf jew mikroskopju invertit). Il-proċessi papillari jingħarfu meta jkun hemm formazzjoni żgħira ta' proċessi viżibbli fuq in-naħa posterjuri tal-joint plate. Ikteb in-numru tal-patt magħqud

([1]) Normalment il-proċessi papillari jidhru biss f'irġiel adulti u jinsabu fuq ix-xewk tal-pinen mit-tieni sas-seba' jew it-tmien waħda jekk wieħed jgħodd min-naħa posterjuri tal-pinna anali (Fig.1 u 2). Madankollu, il-proċessi rarament jidhru fl-ewwel xewka tal-pinna mil-lat posterjuri tal-pinna anali. Dan l-SOP ikopri l-kejl ta' proċessi fuq l-ewwel xewka tal-pinna (l-għadd ta' xewk tal-pinen jirreferi għall-ordni min-naħa posterjuri tal-pinna anali f'dan l-SOP).

▼M7

li jkollu proċessi papillari f'kull xewka tal-pinna fuq il-worksheet (eż. l-ewwel xewka tal-pinna: 0, it-tieni xewka tal-pinna: 10, it-tielet xewka tal-pinna: 12, eċċ.) u daħħal it-total ta' dan in-numru fuq l-spreadsheet tal-Excel għal kull ħuta individwali. Jekk ikun hemm bżonn, ħu ritratt tal-pinna anali u għodd in-numru tal-joint plate bi proċessi papillari fuq ir-ritratt.

(5) Wara l-kejl, poġġi l-pinna anali fit-tubu koniku deskritt f'(1) u aħżnu.

Fig.1.

Dijagramma li turi differenza sesswali fil-forma u d-daqs tal-pinna anali. A, raġel; B, mara. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

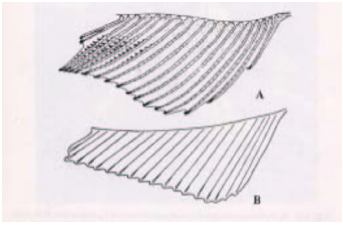


Fig.2.

A, Proċessi fuq joint plates ta' xewka tal-pinna anali. J.P., joint plate; A.S., spazju assjali; P., proċess. B, Estremità distali tax-xewka tal-pinna. L-Aktinotrikiji (Act.) qegħdin fuq il-ponta. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

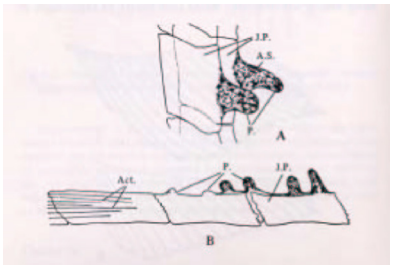
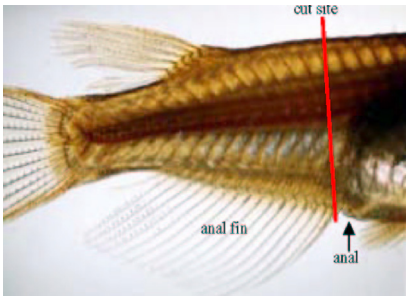


Fig.3.

Ritratt tal-ġisem ta' ħuta li juri l-post tal-qtugħ meta l-gonada tkun iffissata fis-soluzzjoni fissattiva li mhijiex 10 % formalina newtrali bbaferjata. F'dak il-każ, il-ġisem li jifdal jinqata' bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus b'xafra (strixxa ħamra), u l-parti tar-ras tal-ġisem tal-ħuta titqiegħed fis-soluzzjoni fissattiva għall-gonada u l-parti tad-denb ta' ġisem il-ħuta titqiegħed f'10 % formalina newtrali bbaferjata.



▼M7

Appendiċi 6

PROĊEDURI RAKKOMANDATI GĦALL-ĠBIR TAL-KAMPJUNI GĦALL-ANALIŻI TAL-VITELLOĠENINA

Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata bejn il-kampjuni tal-VTG tal-irġiel u tan-nisa.

Proċedura 1 A: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina/Arterja Kawdali

Wara li tingħata l-anestesija, il-pedunkulu kawdali jinqata' parzjalment b'xafra tal-iskarpell u d-demm jinġabar mill-vina/arterja kawdali b'tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Wara li jinġabar id-demm, il-plażma tiġi iżolata malajr permezz ta' ċentrifugazzjoni għal 3 min f'15 000 *g* (jew inkella għal 10 min. f'15 000 *g* f'temperatura ta' 4 °C). Jekk ikun mixtieq, il-perċentwal tal-ematokrit jista' jiġi ddeterminat wara ċ-ċentrifugazzjoni. Imbagħad il-porzjon tal-plażma jitneħħa mit-tubu mikroematokritiku u jinħażen ġo tubu ċentrifugu b'0,13-il unità ta' aprotinin (inibitur tal-proteażi) f'temperatura ta' – 80 °C sakemm tkun tista' ssir id-determinazzjoni tal-vitelloġenina. Skont id-daqs tal-karpjun buras (li jiddependi mis-sess), il-volumi tal-plażma li jistgħu jinġabru ġeneralment ivarjaw minn 5 sa 60 mikrolitru għal kull ħuta (Jensen *et al.* 2001).

Proċedura 1 B: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Qalb

Inkella d-demm jista' jinġabar ukoll permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa eparinizzata (1 000 unità eparina għal kull ml). Id-demm jiġi ttrasferit f'tubi Eppendorf (miżmuma fuq is-silġ) u mbagħad jiġi ċentrifugat (5 min, 7 000 g, f'temperatura ambjentali). Il-plażma għandha tiġi ttrasferita f'tubi Eppendorf nodfa (f'alikwoti jekk il-volum tal-plażma jippermetti li dan isir) u dlonk tiġi ffriżata f'temperatura ta' – 80 °C, sakemm tiġi analizzata (Panter *et al.*, 1998).

Proċedura 2 A: Medaka Ġappuniża, il-Qtugħ tal-Fwied fil-Medaka

It-tneħħija tal-ħuta tat-test mill-kompartiment tat-test

(1) Il-ħut tat-test għandu jitneħħa mill-kompartiment tat-test permezz ta' xibka żgħira f'forma ta' mgħarfa (spoon-net). Ara li ma twaqqax il-ħut tat-test fil-kompartimenti l-oħra tat-test.

(2) Fil-prinċipju, il-ħut tat-test għandu jitneħħa fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-ogħla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv. Barra minn hekk, l-irġiel kollha għandhom jitneħħew minn kompartiment wieħed tat-test qabel ma jitneħħew in-nisa li jifdal.

(3) Is-sess ta' kull ħuta tat-test jiġi identifikat abbażi tal-karatteristiċi sesswali sekondarji esterni (eż. il-forma tal-pinna anali).

(4) Poġġi l-ħut tat-test f'reċipjent għat-trasport u ġorru lejn l-istazzjon tax-xogħol għall-qtugħ tal-fwied. Iċċekkja t-tikketti tal-kompartiment tat-test u tar-reċipjent tat-trasport għall-eżattezza u biex tikkonferma li l-għadd ta' ħut li jkun tneħħa mill-kompartiment tat-test u li l-għadd ta' ħut li fadal fil-kompartiment tat-test huma konsistenti ma' dak li huwa mistenni.

(5) Jekk is-sess ma jkunx jista' jiġi identifikat mid-dehra esterna tal-ħuta, neħħi l-ħut kollu mill-kompartiment tat-test. F'dan il-każ, is-sess għandi jiġi identifikat billi jiġu osservati l-gonadi jew il-karatteristiċi sesswali sekondarji taħt mikroskopju sterjoskopiku.

Qtugħ tal-fwied

(1) Ittrasferixxi l-ħut tat-test mir-reċipjent biex jiġi trasportat lejn is-soluzzjoni anestetika bix-xibka żgħira f'forma ta' mgħarfa.

▼M7

(2) Wara li l-ħut tat-test ikun ġie anestetizzat, ittrasferixxi l-ħut tat-test fuq karta fitru (jew biċċa tal-karti) b'pinzetta (tip bażiku). Meta tkun qed iżżomm il-ħut tat-test, applika l-pinzetta fuq il-ġnub tar-ras biex tevita milli tikser id-denb.

(3) Imsaħ l-ilma fuq wiċċ il-ħuta tat-test fuq il-karta filtru (jew il-biċċa tal-karti).

(4) Poġġi l-ħut bl-addome 'l fuq. Imbagħad agħmel inċiżjoni trażversali żgħira bejn ir-reġjun ventrali tal-għonq u r-reġjun addominali tan-nofs b'imqass tad-dissezzjoni.

(5) Daħħal l-imqass tad-dissezzjoni fl-inċiżjoni ż-żgħira, u agħmel inċiżjoni fl-addome minn punt kawdali għall-branchial mantle għan-naħa kranjali tal-anus tul il-linja tan-nofs tal-addome. Ara li ma daħħalx l-imqass tad-dissezzjoni wisq fil-fond biex tevita milli tagħmel ħsara fil-fwied u l-gonadi.

(6) Wettaq l-operazzjonijiet li ġejjin taħt il-mikroskopju sterjoskopiku.

(7) Poġġi l-ħut tat-test bl-addome 'l fuq, fuq il-biċċa tal-karti (dixx Petri tal-ħġieġ jew lastri tal-ħġieġ huma disponibbli wkoll).

(8) Estendi l-ħitan tal-kavità addominali b'pinzetta ta' preċiżjoni u oħroġ l-organi interni fuq barra. Huwa aċċettabbli wkoll li toħroġ l-organi interni fuq barra billi tneħħi naħa waħda tal-ħajt tal-kavità addominali jekk ikun meħtieġ.

(9) Esponi l-parti mqabbda tal-fwied u tal-marrara b'pinzetta oħra ta' preċiżjoni. Imbagħad aqbad il-kanal tal-bili u aqta' l-marrara barra. Ara li ma tiksirx il-marrara.

(10) Aqbad l-esofagu u bl-istess mod aqta' l-passaġġ gastrointestinali minn mal-fwied. Ara li l-kontenut tal-passaġġ gastrointestinali ma jnixxix. Aqta' l-passaġġ gastrointestinali kawdali minn mal-anus u neħħi l-passaġġ mill-kavità addominali.

(11) Ittrimmja l-massa ta' xaħam u t-tessuti l-oħrajn mill-periferija tal-fwied. Ara li ma tobroxx il-fwied.

(12) Aqbad iż-żona portali tal-fwied permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni u neħħi l-fwied mill-kavità addominali.

(13) Poġġi l-fwied fuq il-lastra tal-ħġieġ. Permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni, neħħi kwalunkwe xaħam addizzjonali u tessut estranju (eż. ir-rita addominali), jekk ikun meħtieġ, mill-wiċċ tal-fwied.

(14) Kejjel il-piż tal-fwied b'mikrotubu ta' 1,5 ml bħala tara permezz ta' miżien analitiku elettroniku. Irreġistra l-valur fuq il-worksheet (jinqara: 0,1 mg). Ikkonferma l-informazzjoni ta' identifikazzjoni fuq it-tikketta tal-mikrotubu.

(15) Agħlaq l-għatu tal-mikrotubu li fih il-fwied. Żommu maħżun fi xtilliera għat-tkessiħ (jew fi xtilliera tas-silġ).

(16) Wara l-qtugħ ta' fwied wieħed, naddaf l-istrumenti tad-dissezzjoni jew ibdilhom ma' oħrajn nodfa.

▼M7

(17) Neħħi l-fwied mill-ħut kollu fir-reċipjent tat-trasport kif deskritt hawn fuq.

(18) Wara l-qtugħ tal-fwied mill-ħut kollu fir-reċipjent tat-trasport (jiġifieri l-irġiel jew in-nisa kollha f'kompartiment tat-test), poġġi l-kampjuni kollha tal-fwied fi xtilliera għat-tubi b'tikketta għall-identifikazzjoni u aħżinha fil-friża. Meta l-fwied jingħata għal pretrattament ftit wara l-qtugħ, il-kampjuni jittieħdu fl-istazzjon tax-xogħol li jmiss fi xtilliera għat-tkessiħ (jew fi xtilliera tas-silġ).

Wara l-qtugħ tal-fwied, il-karkassa tal-ħuta tkun disponibbli għall-istoloġija gonadali u għall-kejl tal-karatteristiċi sesswali sekondarji.

Kampjun

Aħżen il-kampjuni tal-fwied li ttieħdu mill-ħut tat-test f'temperatura ta' ≤ – 70 °C jekk ma jintużawx għall-pretrattament ftit wara l-qtugħ.

Fig-1

Issir qatgħa eżatt wara l-pinen pettorali bi mqass.

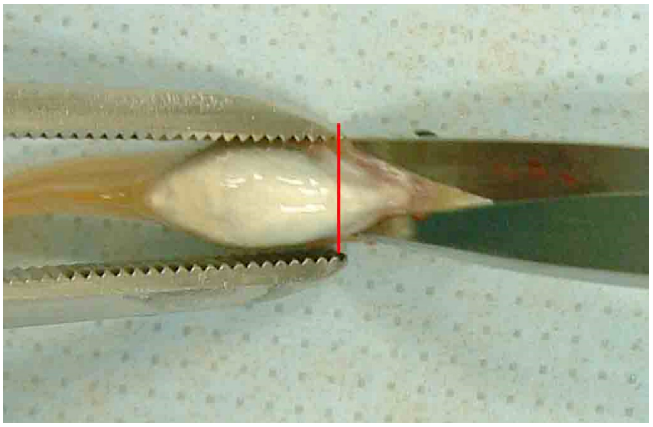
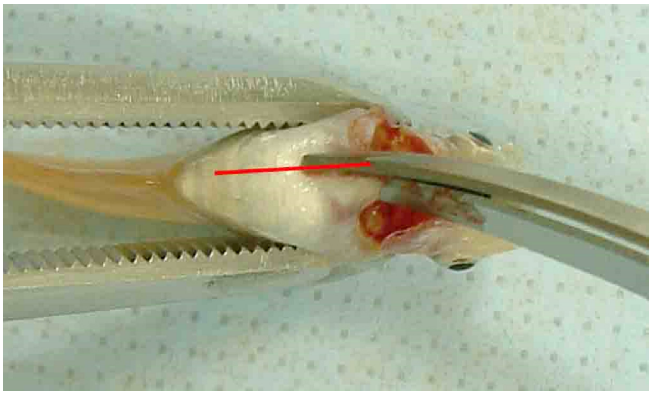


Fig-2

Inċiżjoni fil-linja tan-nofs tal-addome b'imqass sa punt madwar 2 mm kranjali għall-anu.



▼M7

Fig-3

Il-ħitan addominali jinferqu b'forċipi biex jiġi espost il-fwied u organi interni oħra.

(Inkella, il-ħitan addominali jistgħu jiġu ppinjati lateralment). Il-vleġġa turi l-fwied.

Il-vleġġa turi l-fwied.

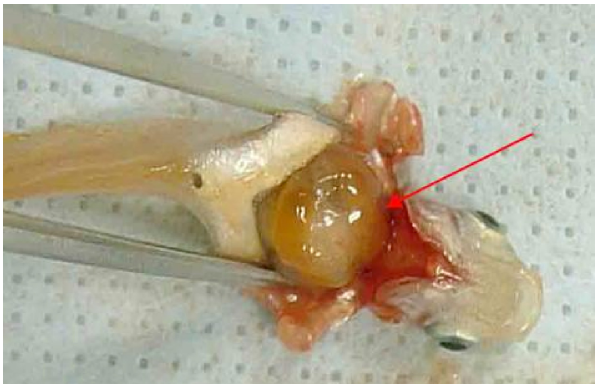


Fig-4

Il-fwied ġie dissezzjonat u jinqata' malajr bil-forċipi.

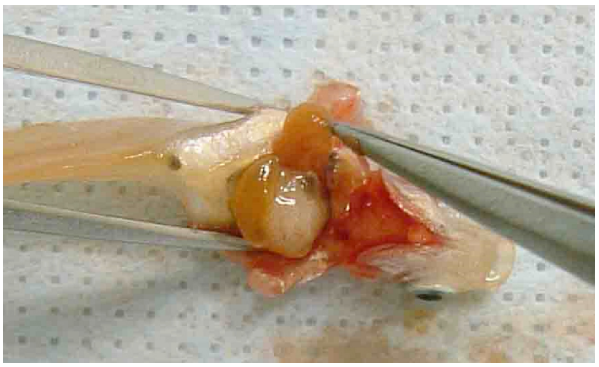
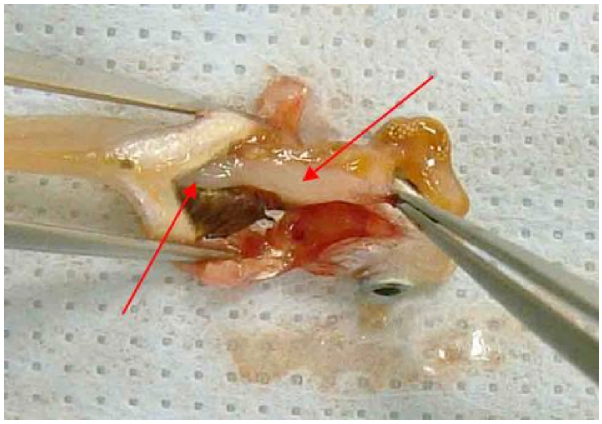


Fig-5

L-intestini jinħarġu bil-galbu permezz tal-forċipi.



▼M7

Fig-6

Iż-żewġ trufijiet tal-intestini u kwalunkwe Appendiċi meżenterika jinqatgħu bl-imqass.

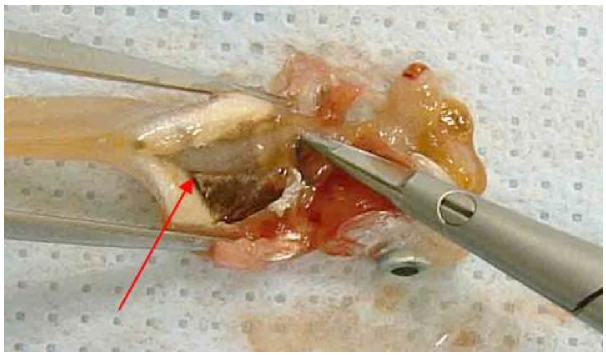


Fig-7 (mara)

Il-proċedura hija identika għall-mara.

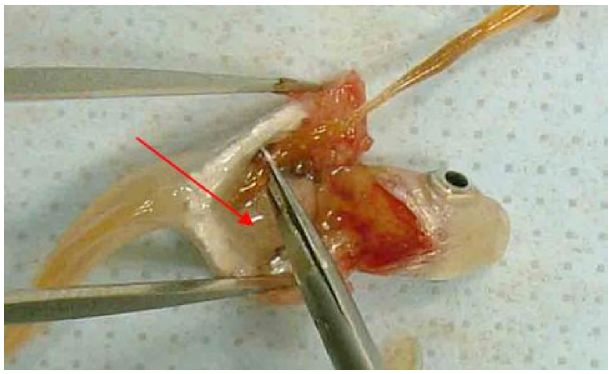
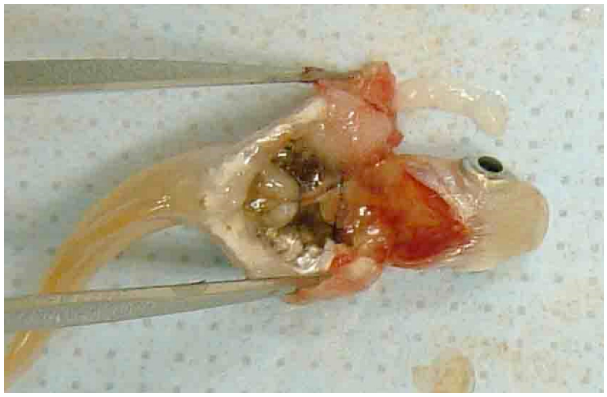


Fig-8

Il-proċedura lesta.



▼M7

Proċedura 2 B: Medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*), Pretrattament tal-Fwied għall-Analiżi tal-Vitelloġenina

Ħu l-flixkun tal-bafer omoġenat mill-kitt ELISA u kessħu b'silġ imfarrak (temperatura tas-soluzzjoni: ≤ 4°C). Jekk ikun qed jintuża bafer omoġenat mis-sistema EnBio ELISA, ħalli s-soluzzjoni toqgħod f'temperatura tal-kamra, u mbagħad kessaħ il-flixkun bis-silġ imfarrak.

Ikkalkola l-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied fuq il-bażi tal-piż tiegħu (żid 50 µl ta' bafer omoġenat għal kull mg tal-piż tal-fwied). Pereżempju, jekk il-piż tal-fwied ikun ta' 4,5 mg, il-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied ikun ta' 225 µl. Ħejji lista tal-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied kollu.

Tħejjija tal-fwied għal pretrattament

(1) Oħroġ il-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied mill-friża eżatt qabel it-trattament minn qabel.

(2) Il-pretrattament tal-fwied mill-irġiel għandu jsir qabel dak tan-nisa biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-vitelloġenina. Barra minn hekk, il-pretrattament għall-gruppi tat-test għandu jsir fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-ogħla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv.

(3) L-għadd ta' mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom kampjuni tal-fwied meħudin mill-friża fi żmien partikolari m'għandux jaqbeż l-għadd li jista' jiġi ċentrifugat dak il-ħin.

(4) Irranġa l-mikrotubi ta' 1,5 ml li fihom il-kampjuni tal-fwied fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq ix-xtilliera tas-silġ (m'hemmx bżonn li l-fwied jinħall).

Operazzjoni tal-pretrattament

1) Żieda tal-bafer omoġenat

Iċċekkja l-lista għall-volum tal-bafer omoġenat li ser jintuża għal kampjun partikolari ta' fwied u aġġusta l-mikropipetta (medda tal-volum: 100-1 000 µl) sakemm jintlaħaq il-volum xieraq. Waħħal ponta nadifa mal-mikropipetta.

Ħu l-bafer omoġenat mill-flixkun tar-reaġent u żid il-bafer mal-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied.

Żid il-bafer omoġenat fil-mikrotubi kollha ta' 1,5 ml li jkun fihom il-fwied skont il-proċedura deskritta hawn fuq. M'hemmx bżonn li tibdel il-ponta tal-mikropipetta ma' waħda ġdida. Madanakollu, jekk il-ponta tkun kontaminata jew ikun hemm suspett li tkun kontaminata, il-ponta għandha tinbidel.

2) Omoġenizzazzjoni tal-fwied

— Waħħal lida ġdida għall-omoġenizzazzjoni mal-omoġenizzatur tal-mikrotubu.

— Daħħal il-lida fil-mikrotubu ta' 1,5 ml. Żomm l-omoġenizzatur tal-mikrotubu biex tagħfas il-fwied bejn il-wiċċ tal-lida u l-ħajt intern tal-mikrotubu ta' 1,5 ml.

— Ħaddem l-omoġenizzatur tal-mikrotubu għal 10 sa 20 sekonda. Matul l-operazzjoni kessaħ il-mikrotubu ta' 1,5 ml b'silġ imfarrak.

▼M7

— Neħħi l-lida mill-mikrotubu ta' 1,5 ml u ħalliha tistrieħ għal madwar 10 sekondi. Imbagħad spezzjona viżwalment l-istat tas-sospensjoni.

— Jekk tara biċċiet ta' fwied fis-sospensjoni, irripeti l-operazzjonijiet (3) u (4) biex tħejji omoġenat sodisfaċenti tal-fwied.

— Kessaħ l-omoġenat tal-fwied sospiż fuq l-ixtilliera tas-silġ sakemm issir iċ-ċentrifugazzjoni.

— Biddel il-lida ma' waħda ġdida għal kull omoġenat.

— Omoġenizza l-fwied kollha bil-bafer omoġenat skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

3) Ċentrifugazzjoni tal-omoġenat tal-fwied sospiż

— Ikkonferma li t-temperatura tal-kompartiment taċ-ċentrifugazzjoni imkessaħ tkun ta' ≤ 5°C.

— Daħħal il-mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom l-omoġenat tal-fwied sospiż f'ċentrifuga mkessħa (aġġusta l-bilanċ jekk ikun hemm bżonn).

— Iċċentrifuga l-omoġenat tal-fwied sospiż f'13 000 g għal 10 min f'temperatura ta' ≤ 5°C. Madankollu, jekk is-supernatanti ikunu ġew separati b'mod adegwat, il-forza ċentrifuga u l-ħin jistgħu jiġu aġġustati skont il-bżonn.

— Wara ċ-ċentrifugazzjoni, ara li s-supernatanti jkunu separati b'mod adegwat (saff tal-wiċċ: lipidu, saff intermedju: supernatant, saff tal-qiegħ: tessut tal-fwied). Jekk is-separazzjoni ma tkunx adegwata, erġa' ċċentrifuga s-sospensjoni fl-istess kondizzjonijiet.

— Neħħi l-kampjuni kollha miċ-ċentrifugu mkessaħ u rranġahom fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq l-ixtilliera tas-silġ. Ara li ma terġax tissospendi kull saff li jkun ġie sseparat wara ċ-ċentrifugazzjoni.

4) Il-ġbir tas-supernatant

— Poġġi erba' mikrotubi ta' 0,5 ml biex fihom taħżen is-supernatant fl-ixtilliera tat-tubi.

— Iġbor 30 µl minn kull supernatant (separat bħala s-saff intermedju) bil-mikropipetta u poġġih f'wieħed mill-mikrotubi ta' 0,5 ml. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq il-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegħ.

— Iġbor is-supernatant u qassmu fiż-żewġ mikrotubi l-oħra ta' 0,5 ml bl-istess mod kif deskritt hawn fuq.

— Iġbor il-bqija tas-supernatant bil-mikropipetta (jekk dan ikun jista' jsir: ≥ 100 µl). Imbagħad itfa' s-supernatant fil-mikrotubu ta' 0,5 ml li jifdal. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq il-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegħ.

— Agħlaq l-għatu tal-mikrotubu ta' 0,5 ml u ikteb il-volum tas-supernatant fuq it-tikketta. Imbagħad kessaħ minnufih il-mikrotubi fuq l-ixtilliera tas-silġ.

— Biddel il-ponta tal-mikropipetta b'waħda ġdida għal kull supernatant. Jekk ikun hemm ammont kbir ta' lipidu mwaħħal mal-ponta, ibdilha ma' waħda ġdida minnufih biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-estratt tal-fwied bix-xaħam.

▼M7

— Qassam is-supernatant ċentrifugat kollu f'erba' mikrotubi ta' 0,5 ml skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

— Wara li tkun qassamt is-supernatant fil-mikrotubi ta' 0,5 ml, poġġihom kollha fl-ixtilliera tat-tubi bit-tikketta ta' identifikazzjoni, u mbagħad iffriżahom fil-friża minnufih. Jekk il-konċentrazzjonijiet tal-VTG jitkejlu eżatt wara l-pretrattament, żomm mikrotubu wieħed ta' 0,5 ml (li fih 30 µl ta' supernatant) kiesaħ fl-ixtilliera tat-tubi u ttrasferixxih fl-istazzjon tax-xogħol fejn se jsir l-assaġġ ELISA. F'dan il-każ, poġġi l-mikrotubi li fadal fl-ixtillieri tat-tubi u ffriżahom fil-friża.

— Wara li tiġbor is-supernatant, armi l-fdalijiet b'mod adegwat.

Ħażna tal-kampjun

Aħżen il-mikrotubi ta' 0,5 ml li jkun fihom is-supernatant tal-omoġenat tal-fwied f'temperatura ta' ≤ -70 °C sakemm jintużaw għall-ELISA.

Proċedura 3 A: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina / Arterja Kawdali

Eżatt wara li tingħata l-anestesija, il-pedunkulu kawdali jinqata' b'mod trażversali, u d-demm jittieħed mill-vina/arterja kawdali permezz ta' tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Il-volumi tad-demm ivarjaw minn 5 sa 15 µl skont id-daqs tal-ħuta. Mat-tubu mikrokapillari jiżdied volum indaqs ta' bafer ta' aprotinin (6 µg/ml f'PBS) u l-plażma tiġi sseparata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (5 minuti b'600 *g*). Il-plażma tinġabar fit-tubi tat-test u tinħażen f'temperatura ta' – 20 °C sakemm tiġi analizzata għall-vitelloġenina jew għal proteini oħrajn ta' interess.

Proċedura 3 B: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm permezz ta' Titqiba fil-Qalb

Biex jiġi evitat milli d-demm jikkoagula u l-proteini jiddegradaw, il-kampjuni jinġabru f'bafer ta' salina b'bafer tal-Fosfat (PBS) li jkun fih eparina (1 000 unità/ml) u l-inibitur tal-proteażi aprotinin (2 TIU/ml). Bħala ingredjenti għall-bafer, huma rrakkomandati eparina, melħ tal-ammonijaka u aprotinin lijofilizzat. Għall-kampjunar tad-demm, hija rrakkomandata siringa (1 ml) b'labra fissa rqiqa (eż. Braun Omnikan-F). Is-siringa għandha timtela minn qabel b'bafer (madwar 100 µl) biex il-volumi żgħar tad-demm minn kull ħuta jitneħħew kompletament. Il-kampjuni tad-demm jittieħdu permezz ta' titqiba fil-qalb. L-ewwel il-ħut għandu jiġi anestetizzat b'MS-222 (100 mg/l). Il-pjan xieraq ta' anestesija jippermetti sabiex l-utent jiddistingwi t-taħbita tal-qalb taż-żebra. Waqt li tkun qed ittaqqab il-qalb, żomm il-pistun tas-siringa taħt pressjoni baxxa. Il-volumi tad-demm li jistgħu jinġabru jvarjaw bejn 20 — 40 mikrolitru. Wara t-titqiba tal-qalb, it-taħlita tad-demm/bafer għandha tintefa' fit-tubu tat-test. Il-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (20 min; 5 000 *g*) u għandha tinħażen f'temperatura ta' – 80 °C sakemm tkun meħtieġa għall-analiżi.

Proċedura 3C: SOP: Żebra, l-omoġenizzazzjoni tar-ras u tad-denb

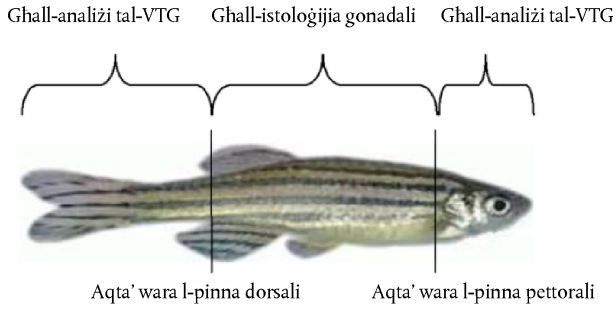
1. Il-ħut jiġi anestetizzat u ewtanizzat skont id-deskrizzjoni tat-test.

2. Ir-ras u d-denb jinqatgħu mill-ħuta skont il-Figura 1.

Importanti: *L-istrumenti kollha tad-dissezzjoni, u l-injama tat-tqattigħ għandhom jitlaħalħu u jitnaddfu sew (eż. b'96 % etanol) bejn l-immaniġġjar ta' kull ħuta biex jiġi evitat "tniġġis tal-vitelloġenina" minn nisa jew irġiel indotti lil irġiel li ma ġewx indotti.*

▼**M7**

Figura 1



3. Il-piż ikkombinat tar-ras u d-denb minn kull ħuta jitkejjel sal-eqreb mg

4. Wara li jintiżnu, il-partijiet jitpoġġew f'tubi adattati (eż. Eppendorf ta' 1,5 ml) u jiġu ffriżati f'– 80 °C sakemm jiġu omoġenizzati jew jiġu omoġenizzati direttament fuq is-silġ b'żewġ pistilli tal-plastik. (Jistgħu jintużaw metodi oħrajn jekk isiru fuq is-silġ u r-riżultat ikun massa omoġena). Importanti: *It-tubi għandhom jiġu nnumerati sew sabiex ir-ras u d-denb mill-ħuta jkunu jistgħu jiġu relatati mas-sezzjoni tal-ġisem rispettiva tagħhom użata għall-istoloġija gonadali.*

5. Meta tintlaħaq massa omoġena, jiżdied **bafer omoġenizzanti** ([1]) kiesaħ silġ li jkun 4 darbiet il-piż tat-tessut. Kompli aħdem bil-pistili sakemm it-taħlita tkun omoġenja. Nota importanti: *Għal kull ħuta jintużaw pistili ġodda.*

6. Il-kampjuni jitqiegħdu fuq is-silġ sakemm issir ċentrifugazzjoni **4 °C** b'50 000 x g għal 30 min.

7. Uża pipetta biex tqassam porzjonijiet ta' 20 µl ta' supernatant f'**mill-inqas** żewġ tubi billi tgħaddas il-ponta tal-pipetta taħt is-saff tax-xaħam fuq il-wiċċ u tiġbed bil-mod is-supernatant mingħajr frazzjonijiet ta' xaħam jew ta' gerbub.

8. It-tubi jinħażnu f'temperatura ta' – 80°C sakemm jiġu biex jintużaw.

([1]) Bafer omoġenizzanti:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Koktejl ta' inibituri tal-proteażi (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Koktejl ta' inibituri tal-proteażi.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) eż. minn Bie & Berntsen, id-Danimarka.
— Koktejl ta' inibituri tal-proteażi: Minn Sigma (għal tessut tal-mammiferi) Numru tal-prodott P 8340.
NOTA: Il-bafer omoġenizzanti għandu jintuża dakinhar stess meta jiġi manifatturat. Poġġi fuq is-silġ waqt li jkun qed jintuża.

▼M7

Appendiċi 7

KAMPJUNI B'FORTIFIKAZZJONI TA' VITELLOĠENINA U STANDARD TA' REFERENZA INTERASSAĠĠ

F'kull jum li jsiru l-assaġġi tal-vitelloġenina, irid jiġi analizzat kampjun taż-żieda magħmul permezz ta' standard ta' referenza interassaġġ. Il-vitelloġenina użata biex isir l-istandard ta' referenza interassaġġ għandha tkun minn lott differenti minn dak użat għat-tħejjija ta' standards tal-kalibrazzjoni għall-assaġġ imwettaq.

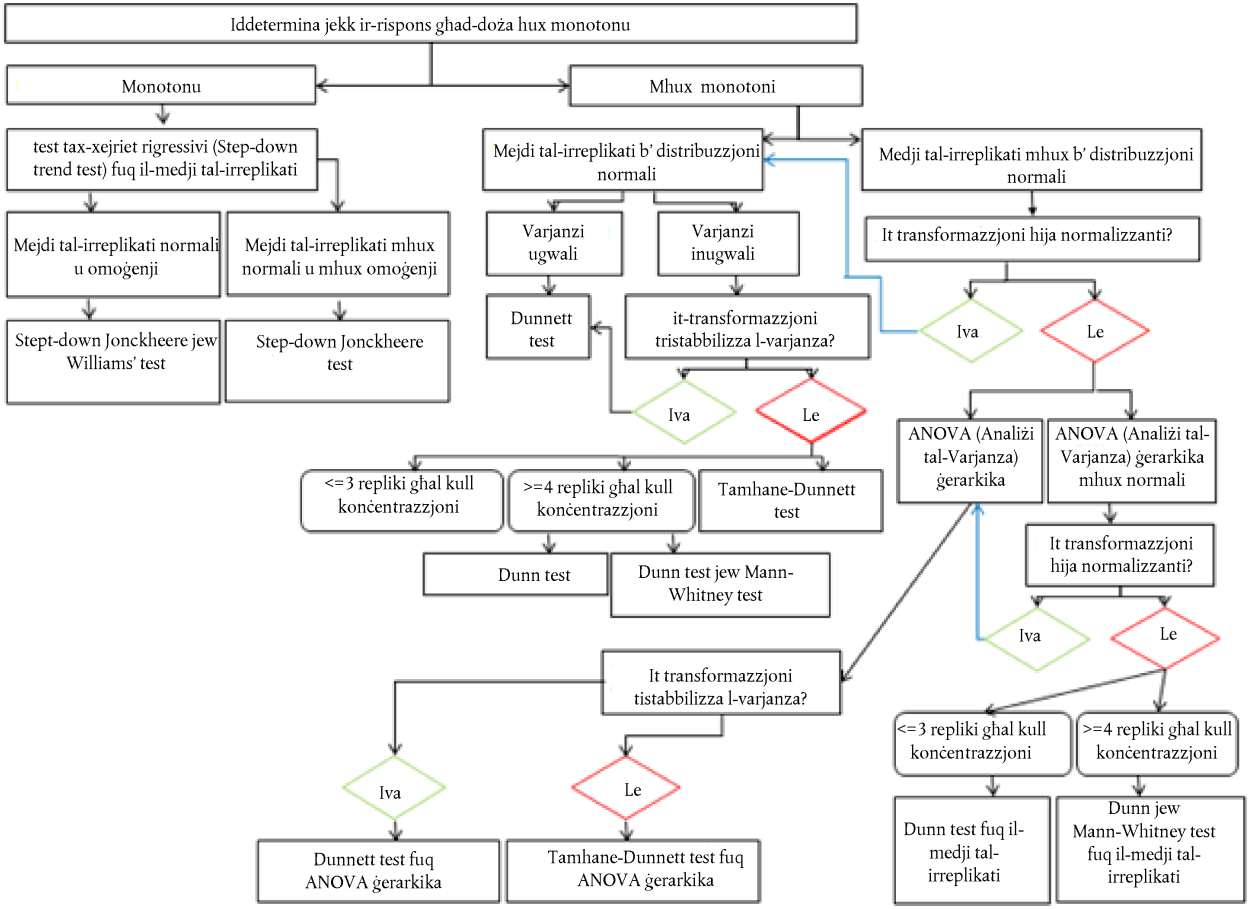
Il-kampjun taż-żieda se jittieħed billi tiżdied kwantità magħrufa tal-istandard interassaġġ ma' kampjun ta' plażma tal-irġiel tal-kontroll. Il-kampjun ser jiġi miżjud sabiex tinkiseb konċentrazzjoni tal-vitelloġenina bejn 10 u 100 darba l-konċentrazzjoni mistennija tal-vitelloġenina tal-ħut maskili ta' kontroll. Il-kampjun tal-plażma tal-irġiel tal-kontroll li huwa miżjud jista' jittieħed minn ħuta waħda jew jista' jkun ġej minn diversi ħut.

Sottokampjun tal-plażma tal-irġiel tal-kontroll mhux miżjuda se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ wells duplikati. Il-kampjun miżjud se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ wells duplikati wkoll. Il-kwantità medja tal vitelloġenina fiż-żewġ kampjuni tal-plażma mhux miżjuda tal-irġiel tal-kontroll tiżdied mal-kwantità kkalkolata tal-vitelloġenina miżjuda maż-żieda tal-kampjuni biex tiġi determinata konċentrazzjoni mistennija. Il-proporzjon ta' din il-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla ser jiġi rrapportat flimkien mar-riżultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

▼M7

Appendiċi 8

FLOWCHART DEĊIŻJONALI GHALL-ANALIŻI STATISTIKA



02008R0440 — MT — 16.10.2019 — 008.001 — 2495

▼M7

C.49. TEST TAT-TOSSIĊITÀ AKUTA TAL-EMBRIJUNI TAL-ĦUT (FET)

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linji gwida tal-OECD (TG) 236 (2013). Dan jiddeskrivi t-Test tat-Tossiċità Akuta tal-Embrijuni tal-Ħut (FET) bl-użu taż-żebra (*Danio rerio*). Dan it-test huwa maħsub biex jiddetermina t-tossiċità akuta ta' sustanzi kimiċi fl-istadji embrijoniċi tal-ħut. It-test FET huwa bbażat fuq studji u attivitajiet ta' validazzjoni mwettqa fuq iż-żebra (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). It-test FET kien applikat b'suċċess għal firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi li juru diversi modi ta' azzjoni, solubilitajiet, volatilitajiet u idrofobiċitajiet (riveduti f'15 u 16).

2. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Bajd taż-żebra li jkunu għadhom kif ġew fertilizzati jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test għal perjodu ta' 96 siegħa. Kull 24 siegħa, sa erba' osservazzjonijiet apikali jiġu rreġistrati bħala indikaturi tal-letalità (6): (i) koagulazzjoni tal-bajd fertilizzat, (ii) nuqqas ta' formazzjoni somite, (iii) nuqqas ta' distakkament tat-tail-bud mill-borża tal-isfar tal-bajd, u (iv) nuqqas ta' taħbit tal-qalb. Fl-aħħar tal-perjodu ta' esponiment, it-tossiċità akuta tiġi ddeterminata fuq il-bażi ta' riżultat pożittiv fi kwalunkwe wieħed mill-erba' osservazzjonijiet apikali rreġistrati, u l-LC_{50} jiġi kkalkulat.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

4. It-tagħrif utli dwar il-karatteristiċi speċifiċi għas-sustanza jinkludi l-formula strutturali, il-piż molekulari, il-purità, l-istabilità fl-ilma u d-dawl, pK_a u K_{ow}, is-solubilità tal-ilma u l-pressjoni tal-fwar, kif ukoll ir-riżultati ta' test għal bijodegradabilità immedjata (TM C.4 (17) jew TM C.29 (18)). Is-solubilità u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jikkalkulaw il-kostant tal-liġi ta' Henry, li se jindika jekk it-telf minħabba l-evaporazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jistax iseħħ. Għandu jkun hemm metodu ta' min jorbot fuqu disponibbli, għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test, b'eżattezza magħrufa u rappurtata kif ukoll il-limitu ta' rivelazzjoni.

5. Jekk il-metodu ta' ttestjar jintuża għall-ittestjar ta' taħlita, il-kompożizzjoni tiegħu għandha, sa fejn ikun possibbli, tkun karatterizzata, eż. bl-identità kimika tal-kostitwenti tagħha, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet speċifiċi għas-sustanza tagħhom (ara l-paragrafu 4). Qabel l-użu tal-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar regolatorju ta' taħlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk hux se jipprovdi riżultati aċċettabbli għall-iskop regolatorju maħsub.

6. Rigward sustanzi li jistgħu jiġu attivati permezz tal-metaboliżmu, hemm evidenza li l-embrijuni taż-żebra għandhom kapaċitajiet tal-bijotrasformazzjoni (19)(20)(21)(22). Madankollu, il-kapaċità metabolika tal-ħut embrijoniku mhix dejjem simili għal dik ta' ħut żgħir jew adult. Pereżempju, il-protosikant alkoħol allyl (9) huwa nieqes fil-FET. Għalhekk, jekk ikun hemm xi indikazzjonijiet li metaboliti jew prodotti tat-trasformazzjoni ta' rilevanza oħrajn jistgħu jkunu aktar tossiċi mill-kompost oriġinarju, huwa wkoll rakkomandat li jitwettaq it-test b'dawn il-metaboliti/prodotti tat-trasformazzjoni u li jużaw dawn ir-riżultati meta jagħmlu konklużjoni dwar it-tossiċità tas-sustanzi kimiċi tat-test, jew inkella jwettqu test ieħor li jieħu aktar kont tal-metaboliżmu.

7. Għal sustanzi b'piż molekulari ≥ 3kDa, struttura molekulari goffa ħafna, u sustanzi li jikkawżaw tfaqqis imdewwem jew inaqqsu l-esponiment ta' wara t-tfaqqis, l-embrijuni mhumiex mistennija li jkunu sensittivi minħabba bijodisponibbiltà limitata tas-sustanza, u testijiet tat-tossiċità oħra jistgħu jkunu aktar xierqa.

▼M7

VALIDITÀ TAT-TEST

8. Biex ir-riżultati tat-test ikunu validi, japplikaw il-kriterji li ġejjin:

a) Ir-rata tal-fertilizzazzjoni ġenerali tal-bajd kollha miġbura għandha tkun ≥ 70 % fil-grupp ittestjat.

b) It-temperatura tal-ilma għandha tinżamm 26 ± 1 °C fil-kompartiment tat-test fi kwalunkwe ħin waqt it-test.

c) Is-sopravivenza totali tal-embrijuni fil-kontroll negattiv (dilwizzjoni-ilma), u, fejn rilevanti, fil-kontroll tas-solvent għandha tkun ≥ 90 % sal-aħħar tal-esponiment ta' 96 siegħa.

d) Esponiment għall-kontroll pożittiv (eż. 4.0 mg/l 3,4-dikloroanilina għaż-żebra) għandu jirriżulta f'mortalità minima ta' 30 % fl-aħħar tal-esponiment ta' 96 siegħa.

e) Ir-rata tat-tfaqqis fil-kontroll negattiv (u kontroll tas-solvent jekk xieraq) għandha tkun ≥80 % fit-tmiem tal-esponiment ta' 96 siegħa.

f) Fl-aħħar tas-96 siegħa esponiment, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlul fil-kontroll negattiv u fil-konċentrazzjoni tal-ogħla test għandha tkun ta' ≥80 % tas-saturazzjoni.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

9. Ħarsa ġenerali tal-kundizzjonijiet rakkomandati tal-manutenzjoni u tat-test hija disponibbli fl-Appendiċi 2.

Tagħmir

10. Huwa meħtieġ it-tagħmir li ġej:

a) Tankijiet tal-ħut magħmula minn materjal kimiku inert (eż. ħġieġ) u ta' kapaċità adattata rigward tat-tagħbija rakkomandata (ara "Manutenzjoni tal-ħut riproduttur", paragrafu 14);

b) Mikroskopju maqlub u/jew binokulari b'kapaċità ta' tkabbir ta' mill-inqas 80 darba. Jekk il-kamra li tintuża għar-reġistrazzjoni tal-osservazzjonijiet ma tistax tiġi aġġustata għal 26 ± 1 °C, l-istadju tal-moviment laterali bit-temperatura kkontrollata jew metodi oħrajn biex tinżamm it-temperatura huma meħtieġa;

c) Kmamar tat-test; eż., 24-well plates standard b'fond ta' madwar 20 mm. (ara "Kmamar tat-test", paragrafu 11);

d) eż., fojl li jeħel waħdu biex jgħatti l-24 well-plates;

e) Inkubatur jew kamra bl-arja kundizzjonata bit-temperatura kontrollata, li tippermetti li tinżamm 26 ±1 °C fil-bjar (jew fil-kmamar tat-test);

f) miter tal-pH;

g) Ossiġenometru;

h) Apparat għad-determinazzjoni tal-ebusija tal-ilma u l-konduttività;

i) Nassa tal-bajd: trejs tal-istrumenti tal-ħġieġ, azzar inossidabbli jew materjali inerti oħra; malja tal-ħadid (daqs tal-gradilja ta' 2 ± 0.5 mm) tal-azzar inossidabbli jew materjal inert ieħor li jipproteġi l-bajd meta jinbiedu; sottostrat riproduttiv (eż. imitazzjonijiet ta' pjanti ta' materjal inert) (TM C.48, Appendiċi 4a (23));

j) Pipetti bi ftuħ imwessa' sabiex jiġbru l-bajd;

▼M7

k) Reċipjenti tal-ħġieġ biex jippreparaw konċentrazzjonijiet tat-test differenti u ilma għat-trattib (beakers, flasks gradwati, ċilindri gradwati u pipetti gradwati) jew biex jiġbru l-bajd taż-żebra (eż. beakers, dixxijiet tal-kristallizzazzjoni);

l) Jekk sistemi tal-esponiment alternattivi, bħall-fluss (24) jew id-dożaġġ passiv (25) jintużaw biex isir it-test, huma meħtieġa faċilitajiet u tagħmir xierqa.

Kompartimenti tat-test

11. Għandhom jintużaw kompartimenti tat-test tal-ħġieġ jew tal-polistiren (eż. 24-well plates b'kapaċità tal-mili ta' 2.5-5 ml għal kull bir). Fil-każ li jkun hemm suspett tal-adsorbiment tal-polistiren (eż., għal sustanzi mhux polari, ċatti b'K_{OW}) għoli, għandhom jintużaw materjali inerti (ħġieġ) biex jitnaqqas it-telf minħabba l-adsorbiment (26). Kompartimenti tat-test għandhom ikunu ppożizzjonati b'mod każwali fl-inkubatur.

Kundizzjonijiet tal-ilma u tat-test

12. Hija rrakkomandata dilwizzjoni tal-ilma tal-manutenzjoni biex jinkisbu livelli ta' ebusija tipiċi ta' varjetà wiesgħa ta' ilmijiet tal-wiċċ. L-ilma tad-dilwizzjoni għandu jiġi ppreparat minn ilma rikostitwit (27). L-ammont ta' ġebla li jirriżulta li jkun fih l-ilma għandu jkun ekwivalenti għal 100-300 mg/l $CaCO_3$ sabiex tiġi evitata preċipitazzjoni eċċessiva tal-karbonat tal-kalċju. Jista' jintuża ilma b'wiċċ karatterizzat tal-bir ieħor jew ilma tal-bir. L-ilma rikostitwit jista' jiġi adattat għal ilma tal-manutenzjoni b'ammont baxx ta' melħ minn diluzzjoni ma' ilma dejonizzat sa proporzjon ta' 1:5 għal ebusija minima ta' 30-35 mg/l $CaCO_3$. L-ilma huwa arjat għas-saturazzjoni tal-ossiġenu qabel iż-żieda tal-kimika tat-test. It-temperatura għandha tinżamm 26 ± 1 °C, fil-bjar, matul it-test. Il-pH għandu jkun f'medda ta' bejn pH 6.5 u 8.5, u ma jvarjax f'din il-medda b'aktar minn 1.5 unità matul it-test. Jekk il-pH mhux mistenni li jibqa' f'din il-medda, għandu jsir aġġustament tal-pH qabel ma jinbeda t-test. L-aġġustament tal-pH għandu jsir b'tali mod li l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-ħażna ma tinbidilx b'xi mod sinifikanti u li l-ebda reazzjoni kimika jew preċipitazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tiġi kkawżata. L-użu tal-klorur tal-idroġenu (HCl) u l-idrossidu tas-sodju (NaOH) biex jikkoreġu l-pH fis-soluzzjonijiet li jkun fihom is-sustanza kimika tat-test huwa rrakkomandat.

Is-soluzzjonijiet tat-test

13. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jistgħu jiġu ppreparati, eż. bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni tal-ħażna. Is-soluzzjonijiet tal-ħażna għandhom preferibbilment jiġu ppreparati billi sempliċiment titħallat jew titħawwad is-sustanza kimika tat-test fl-ilma tad-dilwizzjoni b'mezzi mekkaniċi (eż. billi tħawwad jew bl-ultrasonifikazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test hija diffiċli biex tinħall fl-ilma, għandhom jiġu segwiti l-proċeduri deskritti fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 23 għall-ġestjoni ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli għandhom jiġu segwiti (28). L-użu ta' solventi għandu jiġi evitat, iżda jista' jkun meħtieġ f'xi każijiet sabiex jipproduċi soluzzjoni tal-ħażna konċentrata b'mod xieraq. Fejn jintuża solvent biex jassisti fil-preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-ħażna, il-konċentrazzjoni finali tiegħu m'għandhiex taqbeż il-100 µl/l u għandha tkun l-istess fir-reċipjenti tat-test kollha. Meta jintuża solvent, huwa meħtieġ kontroll tas-solvent addizzjonali.

Manutenzjoni tal-ħut riproduttiv

14. Il-ħażna għat-trobbija taż-żebra mhux espost u tat-tip selvaġġ b'rata ta' fertilizzazzjoni tal-bajd dokumentata sew tintuża għall-produzzjoni tal-bajd. Il-ħut għandu jkun ħieles minn sintomi makroskopikament dixxernibbli ta' infezzjoni u mard u m'għandux ikun sarlu kwalunkwe trattament farmaċewtiku (akut jew profilattiku) għal xahrejn qabel ir-riproduzzjoni. Il-ħut riproduttiv jinżamm f'akwarji b'kapaċità tat-tagħbija rakkomandata ta' 1 l ilma

▼M7

għal kull ħuta u fotoperjodu fiss ta' 12 — 16-il siegħa (29)(30)(31)(32)(33). Ir-rati ta' filtrazzjoni ottimali għandhom jiġu aġġustati; rati ta' filtrazzjoni li jikkawżaw perturbazzjoni żejda tal-ilma għandhom jiġu evitati. Għal kundizzjonijiet tal-għalf, ara Appendiċi 2. Għandu jiġi evitat l-għalf żejjed, u l-kwalità tal-ilma u l-indafa tal-akwarji għandhom jiġu mmonitorjati b'mod regolari u jerġgħu jiġu ssettjati għall-istat inizjali, jekk ikun hemm bżonn.

Ittestjar tal-proficjenza

15. Bħala sustanza kimika ta' referenza, 3,4-dikloroanilina (użat fl-istudji ta' validazzjoni (1)(2)), għandha tiġi ttestjata f'medda tar-rispons ta' konċentrazzjoni sħiħa biex tiġi ċċekkjata s-sensittività tar-razza tal-ħut użata, preferibbilment darbtejn f'sena. Għal kwalunkwe laboratorju li jistabbilixxi inizjalment dan l-assaġġ, għandha tintuża s-sustanza kimika ta' referenza. Laboratorju jista' juża din is-sustanza kimika biex juri l-kompetenza teknika tagħhom fit-twettiq tal-assaġġ qabel jissottometti d-dejta għal skopijiet regolatorji.

Produzzjoni tal-bajd

16. Bajd taż-żebra jistgħu jiġu prodotti permezz ta' gruppi riproduttivi (f'tankijiet riproduttivi individwali) jew permezz ta' riproduzzjoni tal-massa (fit-tankijiet tal-manutenzjoni). Fil-każ ta' gruppi tar-riproduzzjoni, irġiel u nisa (eż., fi proporzjon ta' 2:1) fi grupp tat-tgħammir jitpoġġew f'tankijiet riproduttivi ftit sigħat qabel il-bidu ta' meta jidlam fil-jum ta' qabel it-test. Peress li gruppi tar-riproduzzjoni taż-żebra jistgħu kultant jonqsu milli jbidu, l-użu parallel ta' mill-inqas tliet tankijiet riproduttivi huwa rakkomandat. Biex jiġi evitat ix-xaqlib ġenetiku, il-bajd jinġabar minn minimu ta' tliet gruppi tat-tgħammir, imħallta u magħżula b'mod każwali.

17. Għall-ġbir tal-bajd, nases tar-riproduzzjoni jitpoġġew fit-tankijiet tar-riproduzzjoni jew fit-tankijiet tal-manutenzjoni qabel il-bidu ta' meta jisbaħ fil-jum tat-test. Biex tkun evitata l-predazzjoni tal-bajd minn żebra adulti, in-nases tar-riproduzzjoni huma miksijin b'malja tal-ħadid inerti ta' daqs xieraq (madwar 2 ± 0.5 mm). Jekk jitqies neċessarju, jistgħu jitwaħħlu pjanti artifiċjali magħmula minn materjal inerti (eż., plastik jew ħġieġ) mal-malja bħala stimolu riproduttiv (3)(4)(5)(23)(35). Għandhom jintużaw materjali tal-plastik użati li ma jiffiltrawx (eż., ftalati). It-tgħammir, ir-riproduzzjoni u l-fertilizzazzjoni jseħħu fi żmien 30 minuta wara l-bidu tad-dawl u n-nases tar-riproduzzjoni bil-bajd miġbur jistgħu jitneħħew b'attenzjoni. Huwa rrakkomandat it-tlaħliħ tal-bajd b'ilma rikostitwit wara li jinġabru min-nases tar-riproduzzjoni.

Id-differenzjazzjoni tal-bajd

18. F'26 °C, il-bajd fertilizzat jgħaddi mill-ewwel qasma wara madwar 15-il minuta u l-qasmiet konsekuttivi sinkroniċi jifformaw 4, 8, 16 u 32 blastomers taċ-ċellola (ara Appendiċi 3)(35). F'dawn l-istadji, il-bajd fertilizzat jista' jiġi identifikat b'mod ċar mill-iżvilupp ta' blastula.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tal-esponiment

19. Għoxrin embrijun għal kull konċentrazzjoni (embrijun wieħed għal kull bir) huma esposti għas-sustanza kimika tat-test. L-esponiment għandu jkun b'tali mod li ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali kimika tinżamm matul it-test. Jekk dan mhux possibbli fis-sistema statika, għandu jiġi applikat intervall maniġġevoli semistatiku (eż. tiġdid kull 24 siegħa). F'dawn il-każijiet il-konċentrazzjonijiet tal-esponiment jeħtieġu jiġu vverifikati bħala minimu fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test fil-bidu u fit-tmiem ta' kull intervall tal-esponiment (ara l-paragrafu 36). Jekk konċentrazzjoni ta' esponiment ta' ± 20 % tal-konċentrazzjonijiet nominali ma tistax tiġi sostnuta, il-konċentrazzjonijiet għandhom bżonn jitkejlu fil-bidu u fit-tmiem ta' kull

▼M7

intervall tal-esponiment (ara l-paragrafu 36). Waqt it-tiġdid, għandha tingħata attenzjoni li l-embrijuni jibqgħu miksijin b'ammont żgħir tas-soluzzjonijiet tat-test qodma biex ikun evitat li jinxfu. Id-disinn tat-test jista' jiġi adattat biex jissodisfa r-rekwiżiti tat-test ta' sustanzi speċifiċi (eż,. fluss kontinwu (24) jew sistemi tad-dożaġġ passivi (25) għal sustanzi faċilment degradabbli jew adsorbivi ħafna (29), jew oħrajn għal sustanzi volatili (36)(37)). Fi kwalunkwe każ, għandha tingħata attenzjoni biex jitnaqqas kwalunkwe stress lill-embrijuni. Il-kompartimenti tat-test għandhom jiġu kkondizzjonati mill-inqas għal 24 siegħa bis-soluzzjonijiet tat-test qabel il-bidu tat-test. Il-kundizzjonijiet tat-test huma miġbura fil-qosor fl-Appendiċi 2.

Konċentrazzjonijiet tat-test

20. Normalment, ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test spazjati b'fattur kostanti li ma jaqbiżx it-2.2 huma meħtieġa biex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti statistiċi. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet. L-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha preferibbilment tirriżulta f'letalità ta' 100 %, u l-inqas konċentrazzjoni ttestjata preferibbilment ma għandha tagħti l-ebda effett osservabbli, kif definit fil-paragrafu 28. Test tat-tfittix tal-medda qabel it-test definittiv jippermetti l-għażla tal-firxa tal-konċentrazzjoni xierqa. It-tiftix tal-medda normalment jitwettaq bl-użu ta' għaxar embrijuni għal kull konċentrazzjoni. L-istruzzjonijiet li ġejjin jirreferu għat-twettiq tat-test f'24-well plates. Jekk jintużaw kompartimenti tat-test differenti (eż. dixxijiet Petri żgħar) jew jiġu ttestjati aktar konċentrazzjonijiet, l-istruzzjonijiet għandhom jiġu aġġustati kif jixraq.

21. Dettalji u struzzjonijiet viżwali għall-allokazzjoni ta' konċentrazzjonijiet tul l-24-well plates huma disponibbli fil-paragrafu 27 u l-Appendiċi 4, Figura 1.

Kontrolli

22. Huma meħtieġa kontrolli tal-ilma tad-dilwizzjoni kemm bħala kontroll negattiv kif ukoll bħala kontrolli tal-plate interni. Jekk jiġi osservat aktar minn embrijun 1 mejjet fil-kontroll tal-plates, il-plate tiġi rrifjutata, b'hekk jonqos l-għadd ta' konċentrazzjonijiet użati biex tinkiseb l-LC_{50}. Jekk plate sħiħa tiġi rrifjutata l-abbiltà li tevalwa u tagħraf l-effetti osservati tista' tkun aktar diffiċli, speċjalment jekk il-plate rrifjutata hija l-plate tal-kontroll tas-solvent jew plate li fiha embrijuni trattati jkunu affettwati wkoll. Fl-ewwel każ, it-test għandu jiġi ripetut. Fit-tieni waħda, it-telf ta' grupp(i) tat-trattament kollu minħabba mortalità tal-kontroll interna jista' jillimita l-ħila li jiġu evalwati effetti u jiġu determinati l-valuri LC_{50}.

23. Isir kontroll pożittiv f'konċentrazzjoni fissa ta' 4 mg/l 3,4-dikloroanilina għal kull lott tal-bajd użat għall-ittestjar.

24. Fil-każ li jintuża solvent, grupp addizzjonali ta' 20 embrijun jiġi espost għas-solvent fuq 24-well plate separati, b'hekk ikunu qed iservu bħala kontroll tas-solvent. Biex it-test jiġi kkunsidrat aċċettabbli, is-solvent għandu jintwera li ma jkollu l-ebda effett sinifikanti fuq il-ħin biex ifaqqas, biex jibqa' ħaj, jew jipproduċi kwalunkwe effett avvers ieħor fuq l-embrijuni (ara paragrafu 8c).

Bidu tal-esponiment u durata tat-test

25. It-test jinbeda kemm jista' jkun malajr wara l-fertilizzazzjoni tal-bajd u jintemm wara 96 siegħa ta' esponiment. L-embrijuni għandhom ikunu mgħaddsa fis-soluzzjonijiet tat-test qabel tinbeda l-qasma blastodiska, jew, l-aktar tard, l-istadju 16 taċ-ċellola. Biex jibda l-esponiment b'dewmien minimu, jintgħażel mill-inqas id-doppju tan-numru tal-bajd meħtieġa għal kull grupp tat-trattament u dawn jiġu trasferiti fil-konċentrazzjonijiet u l-kontrolli rispettivi (eż. f'dixxijiet tal-kristallizzazzjoni 100 ml; il-bajd għandhom ikunu mgħottija għal kollox) mhux aktar tard minn 90 minuta wara l-fertilizzazzjoni.

26. Bajd fertilizzat vijabbli għandu jiġi separat minn bajd mhux fertilizzat u jiġi trasferit għal 24-well plates ikkundizzjonati minn qabel għal 24 siegħa u jerġgħu jimtlew b'soluzzjonijiet tat-test ippreparati friski 2 ml fi żmien 180 minuta wara l-fertilizzazzjoni. Permezz tal-istereomikroskopija (preferibbilment tkabbir ta' ≥30-darba), jintagħżel bajd fertilizzat li għaddej minn qsim u

▼M7

ma juri l-ebda irregolarità ovvja waqt il-qsim (eż. nuqqas ta' simetrija, formazzjoni ta' nfafet) jew korrimenti tal-korjon. Għall-ġbir u s-separazzjoni tal-bajd, ara l-Appendiċi 3, Grafika 1 u 3 u l-Appendiċi 4, Grafika 2.

Distribuzzjoni tal-bajd fl-24-well plates

27. Il-bajd huma mqassma f'well plates fin-numri li ġejjin (ara wkoll l-Appendiċi 4, Grafika 1)

— 20 bajda fuq plate waħda għal kull konċentrazzjoni tat-test;

— 20 bajda bħala kontroll tas-solvent fuq plate waħda (jekk ikun meħtieġ);

— 20 bajda bħala kontroll pożittiv fuq plate waħda;

— 4 bajdiet f'ilma tad-dilwizzjoni bħala kontroll tal-plate intern fuq kull wieħed mill-plates t'hawn fuq;

— 24 bajda fl-ilma tad-dilwizzjoni bħala kontroll negattiv fuq plate waħda.

Osservazzjonijiet

28. Osservazzjonijiet apikali mwettqa fuq kull embrijun ittestjat jinkludu: koagulazzjoni tal-embrijuni, nuqqas ta' formazzjoni somite, nuqqas ta' distakkament tad-denb, u nuqqas ta' taħbit tal-qalb (Tabella 1). Dawn l-osservazzjonijiet jintużaw għad-determinazzjoni tal-letalità: Kwalunkwe riżultat pożittiv f'wieħed minn dawn l-osservazzjonijiet ifisser li l-embrijun taż-żebra ikun mejjet. Barra minn hekk, it-tfaqqis huwa rreġistrat fil-gruppi tat-trattament u tal-kontroll fuq bażi ta' kuljum u jibda minn 48 siegħa. Osservazzjonijiet huma reġistrati kull 24 siegħa, sal-aħħar tat-test.

Tabella 1

Osservazzjonijiet apikali tat-tossiċità akuta fl-embrijuni taż-żebra 24-96 siegħa wara l-fertilizzazzjoni.

	Ħinijiet tal-esponiment			
	24 siegħa	48 siegħa	72 siegħa	96 siegħa
Embrijuni koagulati	+	+	+	+
Nuqqas ta' formazzjoni somite	+	+	+	+
Nuqqas ta' distakkament tad-denb	+	+	+	+
Nuqqas ta' taħbit tal-qalb		+	+	+

29. *Koagulazzjoni tal-embrijun:* Embrijuni koagulati huma bojod ħalib u jidhru skuri taħt il-mikroskopju (ara l-Appendiċi 5, Grafika 1). In-numru tal-embrijuni koagulati huwa determinat wara 24, 48, 72 u 96 siegħa.

30. *Nuqqas ta' formazzjoni somite:* F'temperatura ta' 26 ± 1 °C, madwar 20 somites iffurmaw wara 24 siegħa (ara l-Appendiċi 5, Grafika 2) f'embrijun taż-żebra żviluppat normali. Embrijun żviluppat normali juri movimenti involontarji (kontrazzjonijiet minn ġenb għal ġenb). Movimenti involontarji jindikaw il-formazzjoni tas-somites. In-nuqqas ta' somites huwa rreġistrat wara 24, 48, 72 u 96 siegħa. In-nuqqas ta' formazzjoni ta' somites wara 24 siegħa jista' jkun dovut għal ittardjar ġenerali tal-iżvilupp. Mhux aktar tard minn 48 siegħa wara, il-formazzjoni tas-somites għandha tiġi żviluppata. Jekk le, l-embrijuni huma meqjusin mejta.

31. *Nuqqas ta' distakkament tad-denb:* F'embrijun taż-żebra li jiżviluppa normali, id-distakkament tad-denb (ara l-Appendiċi 5, Grafika 3) mill-isfar huwa osservat

▼M7

wara li jitwal il-ġisem embrijoniku. In-nuqqas ta' distakkament tad-denb huwa rreġistrat wara 24, 48, 72 u 96 siegħa.

32. *Nuqqas ta' taħbit tal-qalb:* F'embrijun taż-żebra li jiżviluppa normali f'temperatura ta' 26 ± 1 °C, it-taħbit tal-qalb huwa viżibbli wara 48 siegħa (ara l-Appendiċi 5, Grafika 4). Għandha tittieħed attenzjoni partikolari meta jiġi rreġistrat dan il-punt minħabba li taħbit tal-qalb irregolari (erratiku) *m'għandux* jiġi rreġistrat bħala letali. Barra minn hekk, taħbit tal-qalb viżibbli mingħajr iċ-ċirkolazzjoni fl-aorta abdominalis huwa kkunsidrat mhux letali. Biex jiġi rreġistrat dan l-effett, embrijuni li ma juru l-ebda taħbit tal-qalb għandhom jiġu osservati taħt tkabbir minimu ta' 80x għal mill-inqas minuta. In-nuqqas ta' taħbit tal-qalb huwa rreġistrat wara 48, 72 u 96 siegħa.

33. Rati tat-tfaqqis tal-gruppi tat-trattament u tal-kontroll kollha għandhom jiġu rreġistrati minn 48-il siegħa l-quddiem u jiġu rappurtati. Għalkemm it-tfaqqis mhux effett użat għall-kalkolu tal-LC_{50}, it-tfaqqis jiżgura l-esponiment tal-embrijun mingħajr funzjoni ta' xkiel tal-korjon, u bħala tali jista' jgħin l-interpretazzjoni tad-dejta.

34. Deskrizzjonijiet dettaljati tal-iżvilupp normali (35) u eżempji ta' żvilupp anormali tal-embrijuni taż-żebra huma murija fl-Appendiċi 3 u 5.

Kejliet analitiċi

35. Fil-bidu u fit-tmiem tat-test, jitkejlu l-pH, l-ebusija totali u l-konduttività fil-kontroll(i) u fl-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. F'sistemi tat-tiġdid semistatiċi, il-pH għandu jitkejjel qabel u wara t-tiġdid tal-ilma. Il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu maħlul titkejjel fl-aħħar tat-test fil-kontrolli negattivi u fl-ogħla konċentrazzjoni tat-test b'embrijuni vijabbli, fejn għandha tkun f'konformità mal-kriterji tal-validità tat-test (ara l-paragrafu 8f). Jekk hemm tħassib li t-temperatura tvarja madwar l-24-well plates, it-temperatura titkejjel fi tliet reċipjenti magħżula b'mod każwali. It-temperatura għandha tiġi rreġistrata preferibbilment b'mod kontinwu matul it-test jew, bħala minimu, kuljum.

36. F'sistema statika, il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test għandha titkejjel, bħala minimu, fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test, iżda preferibbilment fit-trattamenti kollha, fil-bidu u fl-aħħar tat-test. F'testijiet semistatiċi (tat-tiġdid) fejn il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test tkun mistennija li tibqa' fi ± 20 % tal-valuri nominali, huwa rrakkomandat li, bħala minimu, l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test ikunu analizzati meta ppreparati friski u immedjatament qabel it-tiġdid. Għal testijiet fejn il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test mhux mistennija li tibqa fi ± 20 % tal-valur nominali, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha għandhom jiġu analizzati meta ppreparati friski u immedjatament qabel it-tiġdid. Fil-każ ta' volum insuffiċjenti għall-analiżi, l-amalgamazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test, jew l-użu ta' kompartimenti surrogati li jkunu tal-istess materjal u li jkollhom l-istess volum tal-proporzjoni tal-wiċċ bħal 24-well plates, jistgħu jkunu utli. Huwa rrakkomandat ħafna li r-riżultati jkunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejla. Meta l-konċentrazzjonijiet ma jibqgħux fi ħdan it-80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom jiġu espressi fir-rigward tal-medja ġeometrika tal-konċentrazzjonijiet imkejla; ara l-Kapitolu 5 fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akwatika ta' Sustanzi u Taħlitiet Diffiċli għal aktar dettalji (28).

IT-TEST TAL-LIMITU

37. Permezz tal-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar, test tal-limitu jista' jitwettaq fuq 100 mg/l tas-sustanza kimika tat-test jew fil-limitu tas-solubbiltà fil-medium tat-test (liema minnhom ikun l-inqas) sabiex juri li l-LC_{50} hija ogħla minn din il-konċentrazzjoni. It-test tal-limitu għandu jitwettaq bl-użu ta' 20 embrijun fit-trattament, il-kontroll pożittiv u — jekk meħtieġ- fil-kontroll tas-solvent u l-24 embrijun fil-kontroll negattiv. Jekk il-perċentwal

▼M7

tal-letalità fil-konċentrazzjoni ttestjata jaqbeż il-mortalità fil-kontroll negattiv (jew il-kontroll tas-solvent) b'10 %, għandu jitwettaq studju sħiħ. Kwalunkwe effett osservat għandu jiġi rreġistrat. Jekk il-mortalità taqbeż l-10 % fil-kontroll negattiv (jew il-kontroll tas-solvent, it-test isir invalidu u għandu jiġi ripetut.

DATA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

38. F'dan it-test, il-wells individwali huma kkunsidrati repliki indipendenti għall-analiżi statistika. Il-perċentwali tal-embrijuni li għalihom mill-inqas waħda mill-osservazzjonijiet apikali hija pożittiva f'48 u/jew 96 siegħa huma mmarkati kontra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Għall-kalkolu tal-inklinazzjonijiet tal-kurva, valuri LC_{50} u l-limiti tal-kunfidenza (95 %), għandhom jiġu applikati metodi statistiċi xierqa (38) u d-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Analiżi Statistika tad-Dejta tal-Ekotossiċità għandu jiġi kkonsultat (39).

Rapport tal-ittestjar

39. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

Sustanza monokostitwenti

— dehra fiżika, solubbiltà fl-ilma, u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impuritajiet bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— karatterizzati kemm jista' jkun bl-identità kimika (ara hawn fuq), okkorrenza kwantitattiva u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Organiżmi tat-test:

— isem xjentifiku, razza, sors u metodu tal-ġbir tal-bajd fertilizzat, u l-użu sussegwenti.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-proċedura tat-test użata (eż., tiġdid semistatiku);

— fotoperjodu;

— id-disinn tat-test (eż., numru ta' kompartimenti tat-test, tipi ta' kontrolli);

— karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma fil-manutenzjoni tal-ħut (eż. pH, kemm fih ġebla, temperatura, konduttività, ossiġenu maħlul);

— konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlul, pH, ebusija totali, temperatura u konduttività tas-soluzzjonijiet tat-test fil-bidu u wara 96 siegħa;

— metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna u soluzzjonijiet tat-test kif ukoll il-frekwenza tat-tiġdid;

▼M7

— ġustifikazzjoni għall-użu ta' solvent u ġustifikazzjoni għall-għażla ta' solvent, jekk huwa xi ħaġa oħra barra ilma;

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test u r-riżultat tal-analiżijiet kollha biex tiddetermina l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test; l-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-limitu ta' kwantifikazzjoni (LoQ) għandhom ukoll jiġu rrappurtati;

— evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji ġenerali tal-validità tas-sopravivvenza;

— rata tal-fertilizzazzjoni tal-bajd;

— rata tat-tfaqqis fil-gruppi tat-trattament u tal-kontroll.

Riżultati:

— konċentrazzjoni massima li ma tikkawżax mortalità matul id-durata tat-test;

— konċentrazzjoni minima li tikkawża mortalità ta' 100 % matul id-durata tat-test;

— mortalità kumulattiva għal kull konċentrazzjoni fil-ħinijiet tal-osservazzjoni rakkomandati;

— il-valuri LC_{50} fis-96 siegħa (u possibbilment fit-48 siegħa) għall-mortalità b'limiti tal-kunfidenza ta' 95 %, jekk possibbli;

— grafika tal-kurva tal-konċentrazzjoni-mortalità fl-aħħar tat-test;

— il-mortalità fil-kontrolli (kontrolli negattivi, kontrolli interni tal-plate, kif ukoll kontroll pożittiv u kwalunkwe kontroll tas-solvent użat);

— dejta dwar ir-riżultat ta' kull wieħed mill-erba' osservazzjonijiet apikali;

— inċidenza u deskrizzjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi u fiżjoloġiċi, jekk ikun hemm (ara l-eżempji pprovduti fl-Appendiċi 5, Grafika 2);

— inċidenti fil-kors tat-test li setgħu influwenzaw ir-riżultati;

— analiżi statistika u trattament tad-dejta (analiżi probit, mudell tar-rigressjoni loġistika u medja ġeometrika għal-LC_{50});

— limiti tal-inklinazzjoni u tal-kunfidenza tar-rigressjoni tal-kurva tal-konċentrazzjoni-rispons (trasformata).

Kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu ta' ttestjar u spjegazzjonijiet rilevanti.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

TAGĦRIF

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼M7

fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209

(17) Chapter C.4 of this Annex: Ready Biodegradability.

(18) Chapter C.29 of this Annex: Ready Biodegradability, CO_2 in sealed vessels.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness: Fish Short Term Reproduction Assay.. Ara l-Appendiċi 4a.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

(27) ISO (1996) International Standards. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Disponibbli: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Kummissjoni Ewropea (2007) Rakkomandazzjoni tal-Kummissjoni 2007/526/KE tat-18 ta' Ġunju 2007 dwar linji gwida għall-akkomodazzjoni u l-kura tal-annimali użati għal skopijiet sperimentali u oħrajn xjentifiċi (notifikat skont in-numru tad-dokument C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF]

(33) Unjoni Ewropea (2010) Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali użati għal skopijiet xjentifiċi. Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea, L 276:33-79; 20.10.2010

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Il-Kapitolu C.2 ta' dan l-Anness: Daphnia sp., Test tal-Immobilizzazzjoni Akuta.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) ISO (2006) Standard Internazzjonali. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Disponibbli: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Dokument ta' reviżjoni dettaljata “Fish embryo toxicity assays” Rapport UBA taħt il-kuntratt Nru 20385422 Aġenzija Federali tal-Ambjent Ġermaniża, Berlin. 298 pp.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Punt ta' tmiem apikali: Li jikkaġuna effett fil-livell tal-popolazzjoni.

Blastula: Formazzjoni ċellulari madwar il-pol tal-annimal li jkopri ċertu parti tal-isfar.

Sustanza Kimika: Sustanza jew taħlita

Epibolija: hija proliferazzjoni enormi ta' ċelloli fil-biċċa l-kbira epidermali fil-fażi tal-gastrulazzjoni tal-embrijun u l-moviment tagħhom mill-ġenb dorsali għal dak ventrali, li permezz tagħha s-saffi taċ-ċelloli entodermali huma internalizzati fi proċess simili għall-invaġinazzjoni u l-isfar ikun inkorporat fl-embrijun.

Test tal-fluss kontinwu: Test bi fluss kontinwu ta' soluzzjonijiet tat-test fis-sistema tat-test matul id-durata tal-esponiment.

Kontroll Intern tal-Plate: Il-kontroll intern jikkonsisti f'4 wells mimlija bl-ilma tad-dilwizzjoni għal kull 24-well plate biex jidentifika l-kontaminazzjoni potenzjali tal-plates mill-manifattur jew mir-riċerkatur waqt il-proċedura, u kwalunkwe effett tal-plate li potenzjalment jinfluwenza l-eżitu tat-test (eż. gradjent tat-temperatura).

IUPAC: Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata

Manutenzjoni tal-ilma: Ilma li fih titwettaq it-trobbija tal-ħut adult.

Konċentrazzjoni Letali Medjana (LC_{50}): Il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li hija stmata li tkun letali għal 50 % tal-organiżmi tat-test fid-durata tat-test.

Test tat-tiġdid semistatiku: Test b'tiġdid regolari tas-soluzzjonijiet tat-test wara perjodi definiti (eż., kull 24 siegħa).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

Somite: Fl-embrijun vertebrat li qed jiżviluppa, is-somites huma mases ta' mesoderm imqassma b'mod laterali mat-tubu newrali, li eventwalment jiżviluppa d-dermis (dermatom), fil-muskoli skeletali (mijotom), u vertebri (sklerotom).

It-test statiku: Test fejn is-soluzzjonijiet tat-test ma jinbidlux matul id-durata tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar

UVCB: Sustanzi ta' kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti ta' reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi

▼M7

Appendiċi 2

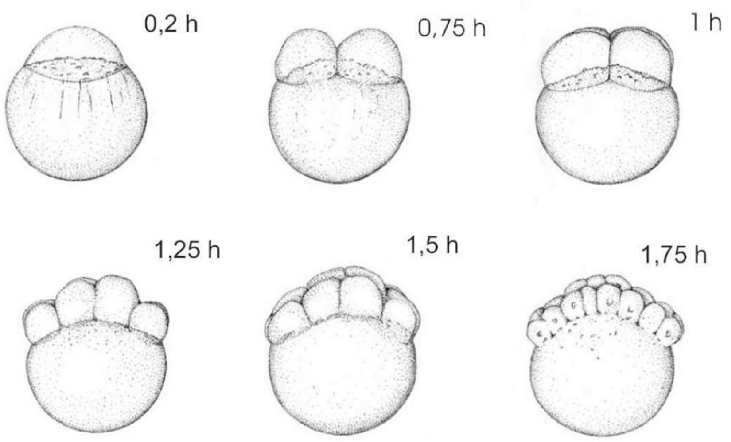
MANUTENZJONI, TGĦAMMIR U KUNDIZZJONIJIET TIPIĊI GĦAT-TESTIJIET TAT-TOSSIĊITÀ AKUTA TAL-EMBRIJUNI TAŻ-ŻEBRA

		Żebra (*Danio rerio*)
Oriġini tal-ispeċi		Indja, Burma, Malakka, Sumatra
Dimorfiżmu sesswali		Nisa: żaqq tisporġi 'l barra, meta jġorru l-bajd Irġiel: aktar irqaq, lewn oranġjo bejn strixxi lonġitudonali blu (partikolarment evidenti fix-xewka anali)
Reġim tal-għalf		Frak tal-ikel xott (flake food) (mass. 3 % piż tal-ħut fil-ġurnata) 3 — 5 darba kuljum; addizzjonalment gambli tal-ilma mielaħ (*Artemia* spec.) *nauplii* u / jew daphnids żgħar ta' daqs xieraq miksuba minn sors mhux kontaminat. L-għalf tal-ikel ħaj jipprovdi sors ta' arrikkiment ambjentali u għalhekk l-ikel ħaj għandu jingħata kull meta jkun possibbli. Biex ikun hemm garanzija għal kwalità tal-ilma ottimali, ikel u ppurgar żejda għandhom jitneħħew madwar siegħa wara l-għalf.
Piż approssimattiv tal-ħut adult		Nisa: 0,65 ± 0,13 g Irġiel: 0,5 ± 0,1 g
Manutenzjoni tal-ħut ġenitur	Illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa); 10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjent); fotoperjodu ta' 12 sa 16-il siegħa
	Temperatura tal-ilma	26 ± 1 °C
	Il-kwalità tal-ilma	O_2 ≥ 80 % saturazzjoni, ebusija: eż. ~ 30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48mg/l, NH_4^+ u NO_2^-: < 0,001 mg/l, kloru residwu < 10 μg/l, kloru organiku totali < 25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Aktar kriterji tal-kwalità tal-ilma	Materja f'partikoli < 20 mg/l, karbonju organiku totali < 2 mg/l, pestiċidi organofosforiċi totali < 50 ng/l, pestiċidi organokloriċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati < 50 ng/l
	Daqs tat-tank għall-manutenzjoni	eż. 180 l, 1 ħuta/l
	Tisfija tal-ilma	Permanenti (iffiltrata bil-faħam); possibbiltajiet oħra jinkludu kombinazzjonijiet b'manutenzjoni tat-tiġdid semistatika jew sistema tal-flus bit-tiġdid tal-ilma kontinwu
	Proporzjon tat-tnissil irġiel għal nisa rakkomandat	2:1 (jew riproduzzjoni tal-massa)
Tankijiet riproduttivi		eż. tankijiet ta' 4 l mgħammra b'qiegħ ta' gradilja tal-azzar u pjanta finta bħala stimulant għar-riproduzzjoni; twapet tas-sħana esterni, jew riproduzzjoni tal-massa fit-tankijiet tal-manutenzjoni
Struttura u dehra tal-bajd		Korjon stabbli (jiġifieri trasparenti ħafna, li ma jwaħħalx, dijametru ~ 0,8-1,5 mm)
Rata tar-riproduzzjoni		Mara matura waħda tbid mill-inqas 50-80 bajda fil-ġurnata. Skont ir-razza, ir-rati riproduttiva jistgħu jkunu konsiderevolment ogħla. Ir-rata tal-fertilizzazzjoni għandha tkun ≥ 70 %. Għal ħut li jbid l-ewwel darba, ir-rati tal-fertilizzazzjoni tal-bajd jistgħu jkunu inqas fl-ewwel ftit drabi li jbidu.
Tip ta' test		Kompartimenti tat-test statiċi, tat-tiġdid semistatiku, tal-fluss, 26 ± 1 °C, 24 siegħa kondizzjonati (eż. 24-well plates 2,5-5 ml għal kull kavità)

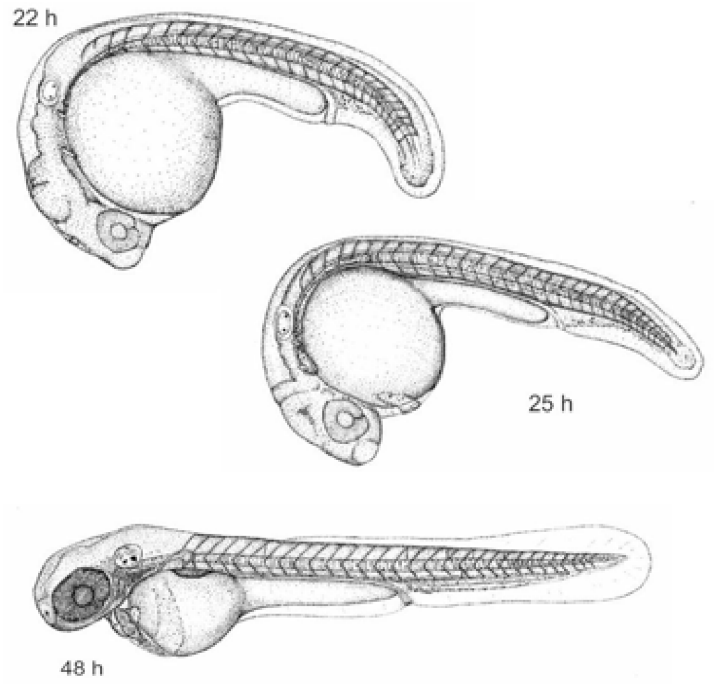
▼M7

Appendiċi 3

ŻVILUPP NORMALI TAŻ-ŻEBRA F'26 °C

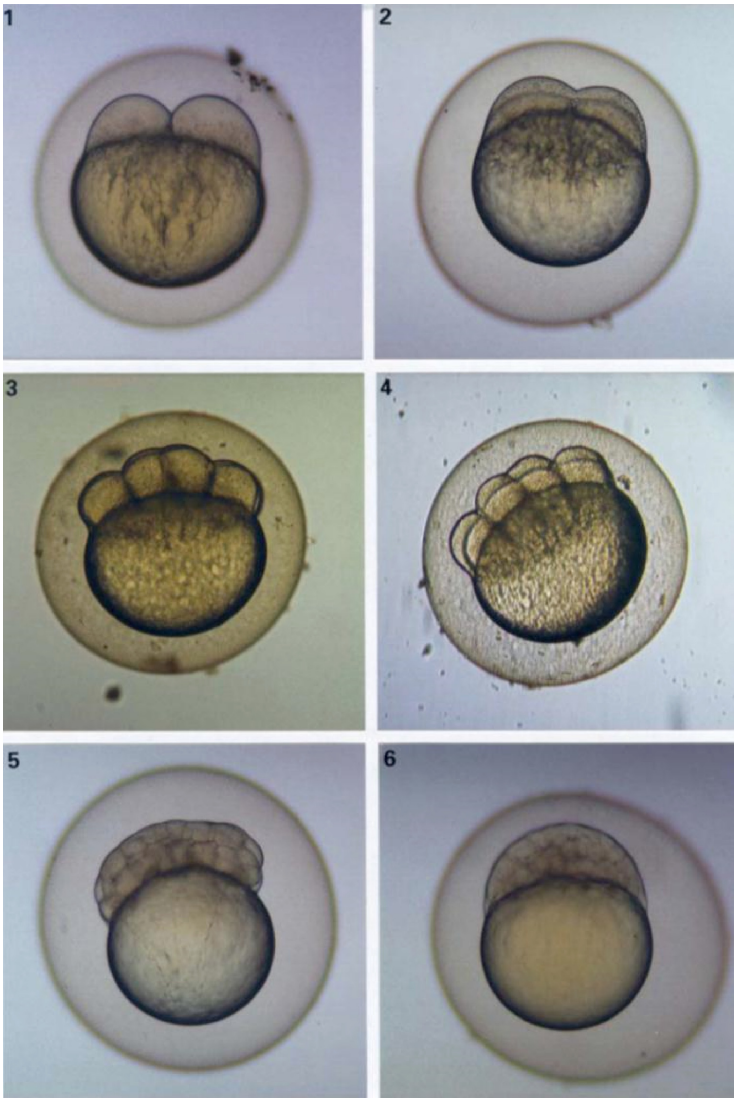


Grafika 1: Stadji magħżula tal-iżvilupp kmieni taż-żebra (Danio rerio): 0,2 — 1,75 siegħa wara l-fertilizzazzjoni (minn Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Is-sekwenza taż-żmien mill-iżvilupp normali tista' tittieħed għad-djanjosi kemm tal-fertilizzazzjoni kif ukoll tal-vijabbiltà tal-bajd (ara l-paragrafu 26: Għażla tal-bajd fertilizzat).



Grafika 2: Stadji magħżula tal-iżvilupp tard taż-żebra (Danio rerio) (embrijun dekorjonat biex jottimizza l-viżibbiltà): 22 — 48 siegħa wara l-fertilizzazzjoni (minn Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

▼M7



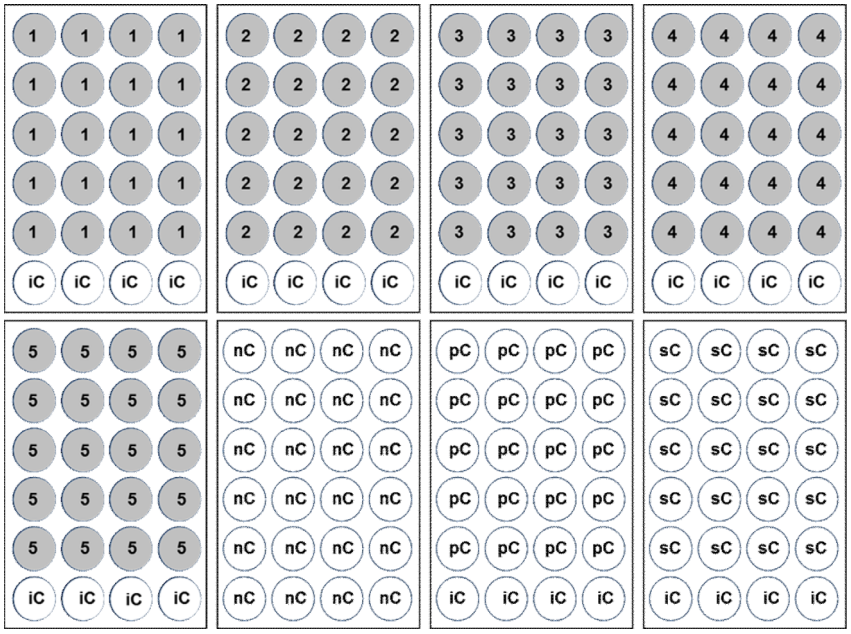
Grafika 3: Żvilupp normali tal-embrijuni taż-żebra (Danio rerio): (1) 0,75 siegħa, stadju-2 taċ-ċellola; (2) 1 siegħa, stadju-4 taċ-ċellola; (3) 1,2 siegħa, stadju-8 taċ-ċellola; (4) 1,5 siegħa, stadju-16 taċ-ċellola; (5) 4,7 siegħa, bidu tal-epiboly; (6) 5,3 siegħa, madwar 50 % epiboly (minn Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼M7

Appendiċi 4

Grafika 1

Tqassim ta' 24-well plates



1-5 = ħames konċentrazzjonijiet tat-test / sustanza kimika;

nC = kontroll negattiv (ilma tad-dilwizzjoni);

iC = kontroll tal-plate intern (ilma tad-dilwizzjoni);

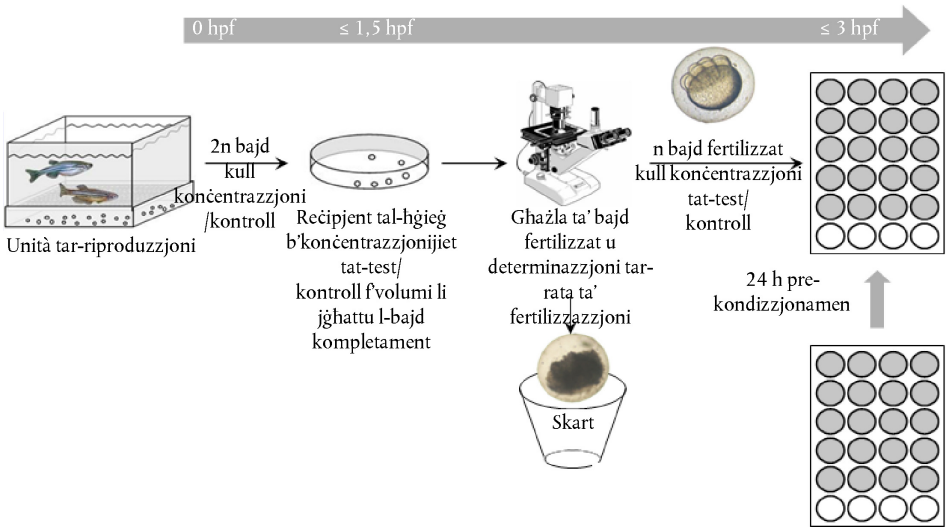
pC = kontroll pożittiv (3,4-DCA 4mg/l);

sC = kontroll tas-solvent

▼M7

Grafika 2

Skema tal-proċess tat-test tat-tossiċita akuta tal-embrijun taż-żebra (mix-xellug għal-lemin): produzzjoni tal-bajd, ġbir tal-bajd, esponiment minn qabel immedjatament wara l-fertilizzazzjoni f'reċipjenti tal-ħġieġ, għażla tal-bajd fertiliżżat b'mikroskopju maqlub jew binokulari u distribuzzjoni tal-bajd fertilizzat f'24-well plate ippreparata bil-konċentrazzjonijiet/kontrolli tat-test rispettivi, n = numru tal-bajd meħtieġ għal kull konċentrazzjoni/kontroll tat-test (hawn 20), hpf = sigħat wara l-fertilizzazzjoni.



▼M7

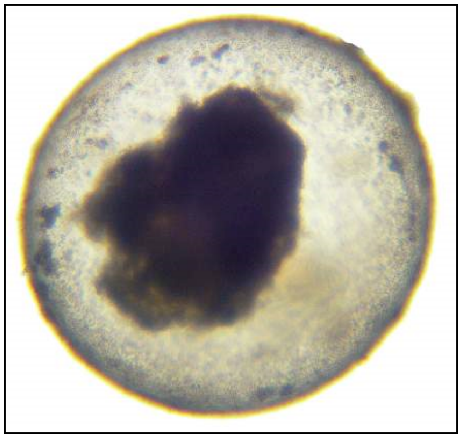
Appendiċi 5

ATLAS TA' PUNTI TAT-TMIEM LETALI GĦAT-TEST TAT-TOSSIĊITÀ AKUTA TAL-EMBRIJUNI TAŻ-ŻEBRA

Il-punti tat-tmiem letali li ġejjin jindikaw tossiċità akuta u, konsegwentement, il-mewt tal-embrijuni: *koagulazzjoni tal-embrijun, nuqqas ta' distakk tad-denb, nuqqas ta' formazzjoni somite u nuqqas ta' taħbit tal-qalb.* Il-mikrografiċi li ġejjin intgħażlu biex juru dawn il-punti tat-tmiem.

Grafika 1:

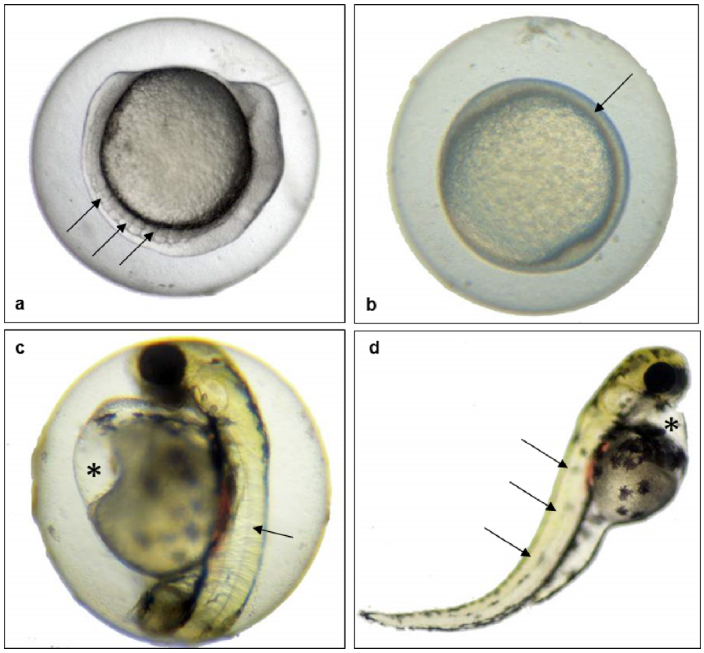
Koagulazzjoni tal-embrijun



Taħt illuminazzjoni qawwija, l-embrijuni koagulati taż-żebra juru varjetà ta'inklużjonijiet mhux trasparenti.

Grafika 2:

Nuqqas ta' formazzjoni somite

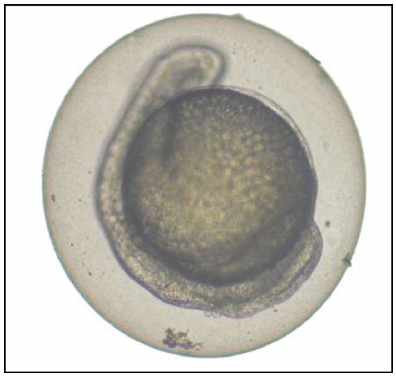


▼M7

Għalkemm ritardati fl-iżvilupp b'madwar 10 sigħat, l-embrijun taż-żebra ta' 24 siegħa f'(a) juri somites żviluppati tajjeb (→), filwaqt li l-embrijun f'(b) ma juri l-ebda sinjal ta' formazzjoni somite (→). Għalkemm juri edema tal-borża tal-isfar tal-bajda evidenti (*), l-embrijun taż-żebra ta' 48 siegħa f'(c) juri żvilupp distint tas-somites (→), filwaqt li l-embrijun taż-żebra ta' 96 siegħa muri f'(d) ma juri l-ebda sinjal ta' formazzjoni somite (→). Innota wkoll il-kurvatura tas-sinsla (skoljożi) u l-edema perikardjali (*) fl-embrijun murija f'(d).

Grafika 3:

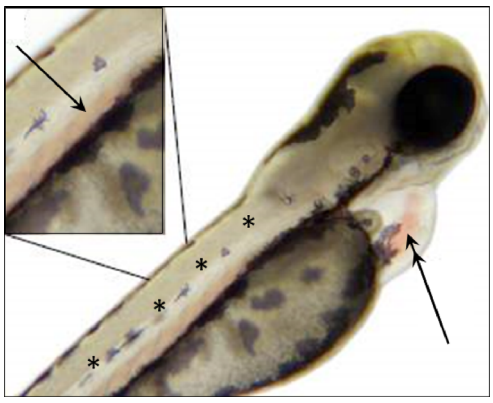
Nuqqas ta' distakkament



tal-boċċa tad-denb fid-dawl laterali (a: →; embrijun taż-żebra ta' 96 siegħa). Innota wkoll in-nuqqas tal-boċċa tal-għajn (*).

Grafika 4:

Nuqqas tat-taħbit tal-qalb



In-nuqqas tat-taħbit tal-qalb huwa, b'definizzjoni, diffiċli biex jintwera f'mikrografika. In-nuqqas tat-taħbit tal-qalb huwa indikat bin-nuqqas ta' konvulżjoni tal-qalb (vleġġa doppja). L-immobbiltà taċ-ċelloli tad-demm, eż. fl-aorta abdominalis (→ fid-daħla) mhix indikatur għal nuqqas ta' taħbit tal-qalb. Innota wkoll in-nuqqas ta' formazzjoni somite f'dan l-embrijun (*, dehra omoġenja mhux segmentali tat-tessuti muskolari). Il-ħin ta' osservazzjoni biex tirreġistra nuqqas ta' taħbit tal-qalb għandu jkun mill-inqas minuta bi tkabbir minimu ta' 80×.

▼M7

C.50. MYRIOPHYLLUM SPICATUM HIELES MIS-SEDIMENT

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linji gwida tat-test OECD 238 (2014). Huwa mfassal biex jevalwa t-tossiċità tas-sustanzi kimiċi għall-*Myriophyllum spicatum*, speċi tal-familja tal-ħaxixa tal-morliti tal-ilma. Huwa bbażat fuq metodu ta' ttestjar eżistenti ASTM (1) modifikat bħala sistema tat-test ħielsa mis-sediment (2) biex jistima l-ekotossiċità intrinsika tas-sustanzi kimiċi tat-test (indipendentement mill-imġiba tad-distribuzzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn l-ilma u s-sediment). Sistema tat-test mingħajr sediment għandha kumplessità analitika baxxa (fil-fażi tal-ilma biss) u r-riżultati jistgħu jiġu analizzati b'mod parallel u/jew f'paragun ma dawk miksuba fit-test *Lemna sp.* (3); barra minn hekk, il-kundizzjonijiet sterili meħtieġa biex l-effetti tal-mikroorganiżmi u tal-alka (assorbiment kimiku/degradazzjoni, eċċ.) jinżammu baxxi kemm jista' jkun. Dan it-test ma jissostitwixxix testijiet tat-tossiċità akwatika oħrajn; minflok dan għandu jikkumplimentahom sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni aktar kompleta tal-periklu akwatiku tal-pjanti u tar-riskju. Dan il-metodu ta' ttestjar ġie vvalidat permezz ta' ring-test (4).

2. Dettalji tal-ittestjar bit-tiġdid (semistatiku) u mingħajr it-tiġdid (statiku) tas-soluzzjoni tat-test huma deskritti. Skont l-objettivi tat-test u r-rekwiżiti regolatorji, huwa rakkomandat l-użu tal-metodu semistatiku, eż. għal sustanzi li jintilfu malajr minn soluzzjoni bħala riżultat tal-volatilizzazzjoni, adsorbiment, fotodegradazzjoni, idroliżi, preċipitazzjoni jew bijodegradazzjoni. F'(5) tingħata gwida ulterjuri. Dan il-metodu ta' ttestjar japplika għal sustanzi li għalihom il-metodu ta' ttestjar ġie vvalidat, (ara d-dettalji fir-rapport tar-ring test (4)) jew għal formulazzjonijiet, jew taħlitiet magħrufa; jekk taħlita tkun ġiet ittestjata, il-kostitwenti tagħha għandhom kemm jista' jkun jiġu identifikati u kwantifikati. Il-metodu ta' ttestjar *Myriophyllum spicatum* mingħajr sediment jikkumplimenta t-Test tat-Tossiċità tas-sediment tal-ilma *Myriophyllum spicatum* (6). Qabel l-użu tal-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar ta' taħlita maħsuba għal skop regolatorju, għandu jiġi kkunsidrat jekk, u jekk ikun hekk għaliex, jista' jipprovdi riżultati adegwati għal dan il-għan. Tali kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa, meta hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Kulturi ta' pjanti li jikbru kontinwament ta' *Myriophyllum spicatum* (biss fil-medium Andrews modifikat, ara l-Appendiċi 2) huma permessi li jikbru bħala monokulturi f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test matul perjodu ta' 14-il ġurnata f'sistema tat-test mingħajr sediment. L-objettiv tal-ittestjar huwa li jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi fuq it-tkabbir veġettativ matul dan il-perjodu abbażi ta' valutazzjonijiet tal-varjabbli ta' kejl magħżula. It-tkabbir tat-tul tar-rimja, tal-fergħat laterali u l-għeruq kif ukoll l-iżvilupp tal-piż frisk u niexef u żieda fis-sepali huma l-varjabbli tal-kejl. Barra minn hekk, jingħata kas tal-bidliet kwalitattivi distinti fl-organiżmi tat-test, bħall-isfigurament jew il-kloroża u n-nekroża indikati bil-kulur isfar jew abjad u kannella. Biex jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi, it-tkabbir fis-soluzzjonijiet tat-test huwa mqabbel ma' dak tal-kontrolli u l-konċentrazzjoni li ġġib inibizzjoni speċifikata x % tat-tkabbir li hija determinata u espressa bħala EC_x; "x" tista' tkun kwalunkwe valur skont ir-rekwiżiti regolatorji, eż. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Għandu jiġi nnotat li l-istimi tal-valuri EC_{10} u EC_{20} huma biss affidabbli u xierqa f'testijiet fejn il-koeffiċjenti tal-varjazzjoni fil-pjanti tal-kontroll jaqgħu taħt il-livell tal-effett li qed ikun stmat, jiġifieri l-koeffiċjenti tal-varjazzjoni għandhom ikunu <20 % għal stima robusta ta' EC_{20}.

4. Kemm ir-rata tat-tkabbir medja speċifika (stmata minn evalwazzjonijiet tat-tul ewlieni tar-rimja u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali) u r-rendiment (stmat miż-żieda fit-tul ewlieni tar-rimja u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali) ta' pjanti mhux trattati u trattati għandhom jiġu determinati. Ir-rata speċifika

▼M7

tat-tkabbir (r) u r-rendiment (y) huma sussegwentement użati biex jiġu determinati E_rC_x (e.g. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) u E_yC_x (e.g. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}), rispettivament.

5. Barra minn ħekk, jistgħu jiġu stabbiliti statistikament il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

6. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku, b'sensittività xierqa għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-mezz tat-test. Informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test li tista' tkun utli biex jistabbilixxu l-kundizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula strutturali, il-purità u l-impuritajiet, is-solubbiltà tal-ilma, l-istabilità fl-ilma u fid-dawl, il-kostant tad-dissoċjazzjoni tal-aċidu (pK_a), il-koeffiċjent tal-partizzjoni oktanol-ilma (K_{ow}), il-pressjoni tal-fwar u l-bijodegrabbiltà. Is-solubbiltà fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-kostant ta' Henry's Law, li jindika jekk huwiex probabbli telf sinifikanti fis-sustanza kimika tat-test matul il-perjodu tal-ittestjar. Dan sejjer jgħin biex jindika jekk għandhomx jittieħdu passi partikolari biex jiġi kkontrollat tali telf. Meta l-informazzjoni dwar is-solubbiltà u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test mhix ċerta, huwa rrakkomandat li din tiġi vvalutata skont il-kundizzjonijiet tat-test, jiġifieri medium tat-tkabbir, temperatura, reġim tad-dawl li għandhom jintużaw fit-test.

7. Il-kontroll tal-pH tal-medium tat-test huwa partikolarment importanti, eż. meta jiġu ttestjati metalli jew sustanzi li huma idrolitikament instabbli. Aktar gwida għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi b'karatteristiċi kimiċi fiżiċi li jagħmluha diffiċli biex isir it-test hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD (5).

VALIDITÀ TAT-TEST

8. Sabiex it-test ikun validu, il-ħin tal-irduppjar tat-tul tar-rimja prinċipali fil-kontroll għandu jkun inqas minn 14-il ġurnata. Bl-użu tal-kundizzjonijiet tal-midja u tat-test deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar, dan il-kriterju jista' jinkiseb bl-użu ta' reġim tat-test statiku jew semistatiku.

9. Il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni għar-rendiment ibbażat fuq kejl tal-piż frisk tar-rimja (jiġifieri mill-bidu tat-test għat-terminazzjoni tat-test) u l-varjabbli tal-kejl addizzjonali (ara l-paragrafu 37) fil-kulturi ma jaqbżux il-35 % bejn ir-repliki.

10. Aktar minn 50 % tar-repliki tal-grupp ta' kontroll jinżammu sterili matul il-perjodu ta' esponiment ta' 14-il ġurnata, li jfisser li jkunu viżibbilment ħielsa mill-kontaminazzjoni minn organiżmi oħra bħall-alka, fungi u batterji (soluzzjoni ċara). *Nota:* Gwida dwar kif tiġi vvalutata l-isterilità hija pprovduta fir-rapport tar-ring-test (4).

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

11. Sustanza(i) ta' referenza, bħal 3,5-diklorofenol użat fir-ring test (4), jistgħu jiġu ttestjati bħala mezz tal-kontroll tal-proċedura tat-test. mid-dejta tar-ring test, il-valuri medji EC_{50} ta' 3,5-DCP għall-varjabbli tar-rispons differenti (ara l-paragrafi 37-41 ta' dan il-metodu ta' ttestjar) huma bejn 3.2 mg/l u 6.9 mg/l (ara r-rapport tar-ring test għal dettalji dwar l-intervall tal-kunfidenza għal dawn il-valuri). Huwa rrakkomandat li tiġi ttestjata sustanza kimika ta' referenza tal-inqas darbtejn f'sena jew, fejn jitwettaq ittestjar bi frekwenza inqas, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test.

▼M7

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Tagħmir

12. It-tagħmir kollu f'kuntatt mal-media tat-test għandu jkun magħmul mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. L-oġġetti tal-ħġieġ li jintużaw għal finijiet ta' kulturi u ttestjar għandhom jitnaddfu minn kontaminanti kimiċi li jistgħu jinfiltraw fil-medium tat-test u għandhom ikunu sterili. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu twal biżżejjed għar-rimja fir-reċipjenti tal-kontroll biex jikbru fil-fażi tal-ilma mingħajr ma jilħqu l-wiċċ tal-medium tat-test fl-aħħar tat-test. Huma rrakkomandati tubi tat-testijiet tal-ħġieġ tal-borosilikat ħoxnin mingħajr xoffa, dijametru ta' madwar 20 mm, tul ta' madwar 250 mm, b'tappijiet tal-aluminju.

13. Peress li l-medium Andrews modifikat fih is-sukrosju (li jistimula t-tkabbir tal-fungi u l-batterji), is-soluzzjonijiet tat-test għandhom jiġu ppreparati taħt kundizzjonijiet sterili. Il-likwidi kollha kif ukoll it-tagħmir huma sterilizzati qabel l-użu. L-isterilizzazzjoni ssir permezz ta' trattament tal-arja msaħħna (210 °C) għal 4 sigħat jew awtoklava għal 20 minuta f'121 °C. Barra minn hekk, il-flasks, dixxijiet, skutelli, eċċ. kollha u tagħmir ieħor jgħaddu minn trattament tal-fjamma fuq workbench sterili eżatt qabel l-użu.

14. Il-kulturi u r-reċipjenti tat-test ma għandhomx jinżammu flimkien. Dan jintlaħaq bl-aħjar mod permezz ta' kompartimenti, inkubaturi, jew kmamar ta' tkabbir ambjentali separati. L-illuminazzjoni u t-temperatura għandhom ikunu kontrollabbli u jinżammu f'livell kostanti.

Organiżmu tat-test

15. *Myriophyllum spicatum* — dikotiledon akwatiku mgħarraq — huwa speċi tal-familja tal-ħaxixa tal-morliti tal-ilma. Bejn Ġunju u Awwissu, fjuri roża-bojod moħbija jisporġu minn fuq il-wiċċ tal-ilma. Il-pjanti huma miżrugħin fl-art permezz ta' sistema ta' riżomi robusti u jistgħu jinstabu fl-emisfera tat-tramuntana kollha f'ilmijiet kalmi ewtrofiċi, iżda mhux imniġġsa u aktar kalċiferi b'sottostrat tat-tajn. Il-*Myriophyllum spicatum* jippreferi l-ilma frisk, iżda jinsab fl-ilma salmastru wkoll.

16. Għat-test tat-tossiċità mingħajr sediment, huma meħtieġa pjanti sterili. Jekk il-laboratorju tal-ittestjar ma jkollux kulturi regolari tal-*Myriophyllum spicatum*, il-materjal tal-pjanti sterili jista' jinkiseb minn laboratorju ieħor jew materjal tal-pjanti (mhux sterili) jista' jittieħed mill-post jew jiġi pprovdut minn fornitur kummerċjali; jekk il-pjanti jiġu mill-post, tkun prevista verifikazzjoni tassonomika tal-ispeċi. Jekk miġbura mill-post jew pprovduti minn fornitur kummerċjali, il-pjanti għandhom jiġu sterilizzati (1) u miżmuma f'kultura fl-istess medium bħal dak użat għall-ittestjar għal minimu ta' tmien ġimgħat qabel l-użu. Siti tal-kamp użati għall-ġbir tal-kulturi tal-bidu għandhom ikunu ħielsa minn sorsi ovvji tal-kontaminazzjoni. Għandha tingħata attenzjoni kbira biex jiġi żgurat li l-ispeċi korretta tinkiseb meta tinġabar il-*Myriophyllum spicatum* mill-post, speċjalment f'reġjuni fejn tista' tibridizza ma' speċi oħra *Myriophyllum*. Jekk miksuba minn laboratorju ieħor għandhom jinżammu b'mod simili għal minimu ta' tliet ġimgħat. Is-sors tal-materjal tal-pjanti u l-ispeċi użati għall-ittestjar dejjem għandhom jiġu rrappurtati.

17. Il-kwalità u l-unformità tal-pjanti użati għall-ittestjar sejjer ikollhom influwenza sinifikanti fuq l-eżitu tal-ittestjar u għandhom għalhekk jintgħażlu b'attenzjoni. Għandhom jintużaw pjanti żgħar li jikbru rapidament mingħajr leżjonijiet jew diskolorazzjoni (kloroži) evidenti. Dettalji dwar il-preparazzjoni tal-organiżmu tat-test huma mogħtija fl-Appendiċi 4.

Kultivazzjoni

18. Biex titnaqqas il-frekwenza tal-manteniment tal-kultura (eż. meta l-ebda test għal *Myriophyllum* ma jkun ippjanat għal perjodu), il-kulturi jistgħu jinżammu taħt illuminazzjoni u temperatura mnaqqsa(50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Id-dettalji tal-produzzjoni ta' kulturi huma mogħtija fl-Appendiċi 3.

▼M7

19. Mill-inqas 14 sa 21 ġurnata qabel l-ittestjar, huma trasferiti b'mod asettiku biżżejjed organiżmi tat-test f'medium sterili frisk u jiġu kkulturati għal 14 sa 21 ġurnata taħt il-kundizzjonijiet tat-test bħala kultura ta' qabel. Dettalji għall-preparazzjoni tal-pre-kultura huma mogħtija fl-Appendiċi 4.

Medium tat-test

20. Medium tan-nutrijent wieħed biss huwa rrakkomandat għall-*Myriophyllum spicatum* f'sistema tat-test ħielsa mis-sediment, kif deskritt fl-Appendiċi 2. Modifika tal-medium Andrews hija rakkomandata għall-kulturazzjoni u l-ittestjar bil-*Myriophyllum spicatum* kif deskritt f'(1). Minn ħames soluzzjonijiet tal-ħażna tan-nutrijenti ppreparati b'mod separat biż-żieda ta' 3 % sukrosju, se jiġi rranġat il-medium Andrews modifikat. Dettalji dwar il-preparazzjoni tal-medium huma mogħtija fl-Appendiċi 2.

21. Medium Andrews ikkonċentrat għaxar darbiet huwa meħtieġ biex jinkisbu s-soluzzjonijiet tat-test (bid-dilwizzjoni kif xieraq). Il-kompożizzjoni ta' dan il-medium hija mogħtija fl-Appendiċi 2.

Is-soluzzjonijiet tat-test

22. Is-soluzzjonjiet tal-ittestjar, ġeneralment jiġu ppreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjonijiet tal-ħażna tas-sustanza kimika tat-test huma normalment ippreparati billi tinħall is-sutanza kimika f'ilma demineralizzat (jiġifieri distillat jew dejonizzat). Iż-żieda tan-nutrijenti se tinkiseb bl-użu tal-medium Andrews modifikat ikkonċentrat għaxar darbiet.

23. Is-soluzzjonijiet tal-ħażna tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jiġu sterilizzati b'awtoklava f'121 °C għal 20 minuta jew bil-filtrazzjoni sterili, sakemm it-teknika tal-isterilizzazzjoni użata ma tiddenaturalizzax is-sustanza kimika tat-test. Soluzzjonijiet tat-test jistgħu jiġu ppreparati f'ilma jew f'medium sterili demineralizzat, taħt kundizzjonijiet sterili. L-istabilità termali u l-adsorbiment fuq uċuħ differenti għandhom jitqiesu fl-għażla tal-proċedura tal-isterilizzazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna tas-sustanza kimika tat-test. Minħabba dan, huwa rrakkomandat li s-soluzzjonijiet tal-ħażna jiġu ppreparati taħt kundizzjonijiet sterili, jiġifieri bl-użu ta' materjal sterili biex tinħall is-sustanza kimika tat-test taħt kundizzjonijiet sterili (eż. sterilizzazzjoni bi fjamma, kapep għall-fluss luminari, eċċ.) f'ilma sterili. Din it-teknika tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna sterili hija valida għaż-żewġ sustanzi u taħlitiet.

24. L-ogħla konċentrazzjoni ttestjata tas-sustanza kimika tat-test normalment m'għandhiex teċċedi s-solubbiltà tal-ilma taħt il-kundizzjonijiet tat-test. Għal sustanzi kimiċi ta' solubbiltà tal-ilma baxxa jista' jkun meħtieġ li tiġi ppreparata soluzzjoni tal-ħażna konċentrata jew dispersjoni tas-sustanza kimika bl-użu ta' solvent organiku jew dispersant sabiex jiffaċilita ż-żieda ta' kwantitajiet preċiżi tas-sustanza kimika tat-test għall-medium tat-test u jgħin fid-dispersjoni u x-xoljiment tiegħu. Għandu jsir kull sforz possibbli biex jiġi evitat l-użu ta' tali materjali. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossiċità li tirriżulta mill-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi awżiljarji. Pereżempju, solventi li jintużaw b'mod komuni li ma jikkawżawx fitotossiċità fil-konċentrazzjonijiet sa 100 µl//l jinkludu aċeton u dimetilformamid. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv, il-konċentrazzjoni finali tiegħu għandha tiġi rrappurtata u miżmuma l-inqas possibbli (≤ 100 µl/l), u t-trattamenti u l-kontrolli kollha għandu jkollhom l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew aġent dispersiv. F'(5) tingħata gwida ulterjuri dwar l-użu ta' aġenti dispersivi.

Gruppi tat-test u ta' kontroll

25. Għarfien minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għal *Myriophyllum spicatum* minn test li jsib il-medda se jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa. Fit-test definittiv tat-tossiċità, għandu normalment ikun hemm ħames (bħal fit-test tal-inibizzjoni tat-tkabbir *Lemna*, Kapitolu C.26 ta' dan l-Anness) għal seba' konċentrazzjonijiet tat-test irranġati f'serje ġeometrika; għandhom jintagħżlu sabiex il-valuri NOEC u EC_{50} jiġu kklassifikati skont il-medda tal-konċentrazzjoni (ara hawn taħt). Preferibbilment il-fattur tas-separazzjoni bejn

▼M7

il-konċentrazzjonijiet tat-test m'għandux jaqbeż it-3.2; madankollu, jista' jintuża valur ogħla meta l-kurva tal-konċentrazzjoni-rispons tkun waħda ċatta. Għandha tingħata ġustifikazzjoni meta jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet. Mill-inqas għandhom jintużaw ħames repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test.

26. Fl-istabbiliment tal-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (għas-sejba tal-medda u/jew għat-test finali tat-tossiċità), għandu jiġi kkunsidrat li ġej:

Għad-determinazzjoni ta' EC_x, il-konċentrazzjonijiet tat-test iridu jsostnu l-valur EC_x sabiex jiġi żgurat livell ta' kunfidenza adegwat. Pereżempju, jekk tkun qed tikkalkula EC_{50}, l-iktar konċentrazzjoni għolja għandha tkun ikbar mill-valur tal-EC_{50}. Jekk il-valur EC_{50} jinstab barra l-firxa ta' konċentrazzjonijiet tat-test, intervalli ta' kunfidenza assoċjati jkunu kbar u valutazzjoni xierqa tal-fit statistiku tal-mudell tista' ma tkunx possibbli.

Jekk l-għan huwa li jiġu stmati l-LOEC/NOEC, l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ma jkunx ferm iktar baxx minn dak tal-kontroll. Barra minn hekk, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ikun ferm inqas milli fil-kontroll. Jekk dan ma jkunx il-każ, it-test għandu jiġi ripetut permezz ta' medda ta' konċentrazzjoni differenti (sakemm l-ogħla konċentrazzjoni tkun fil-limitu tas-solubbiltà jew il-konċentrazzjoni limitu meħtieġa massima, eż. 100 mg/l).

27. Kull test għandu jinkludi kontrolli li jikkonsistu fl-istess medium tan-nutrijent, organiżmu tat-test (l-għażla tal-materjal tal-pjanti l-aktar omoġenja possibbli, frieħi laterali friski minn kulturi ta' qabel, imqassra għal 2.5 cm mill-bażi), kundizzjonijiet u proċeduri ambjentali bħala reċipjenti tat-test iżda mingħajr is-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv awżiljari, għandu jiġi inkluż trattament ta' kontroll addizzjonali bis-solvent/aġent dispersiv preżenti fl-istess konċentrazzjoni bħar-reċipjenti bis-sustanza kimika tat-test. In-numru ta' reċipjenti tal-kontroll ripetut (u reċipjenti tas-solvent, jekk applikabbli) għandu jkun mill-inqas għaxra.

28. Jekk ma tkunx meħtieġa determinazzjoni tal-NOEC, id-disinn tal-ittestjar jista' jiġi mmodifikat biex jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. Madankollu, fi kwalunkwe każ in-numru ta' repliki tal-kontroll għandu jkun mill-inqas għaxra.

Esponiment

29. Frieħi laterali friski minn kultura minn qabel imqassra għal 2.5cm mill-bażi huma assenjati b'mod każwali fir-reċipjenti tat-test taħt kundizzjonijiet asettiċi; kull reċipjent tat-test għandu jkun fih fergħa laterali ta' 2.5 cm li għandu jkollha meristem apikali fuq tarf wieħed. Il-materjal tal-pjanti magħżul għandu jkun tal-istess kwalità f'kull reċipjent tat-test.

30. Huwa meħtieġ disinn aleatorju għal-lokazzjoni tar-reċipjenti tat-test fl-inkubatur biex titnaqqas l-influwenza tad-differenzi spazjali fl-intensità tad-dawl jew it-temperatura. Huwa meħtieġ ukoll disinn ibblokkat jew pożizzjonar każwali tar-reċipjenti (jew pożizzjonar mill-ġdid aktar frekwenti) meta jsiru l-osservazzjonijiet.

31. Jekk test preliminari tal-istabilità juri li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tistax tinżamm (jiġifieri l-konċentrazzjoni mkejla taqa' taħt it-80 % tal-konċentrazzjoni mkejla inizjali) matul id-durata tat-test (14-il ġurnata), huwa rakkomandat reġim tat-test semistatiku. F'dan il-każ, il-pjanti għandhom jiġu esposti għal test u soluzzjonijiet tal-kontroll ippreparati friski

▼M7

mill-inqas f'okkażjoni waħda waqt it-test (eż.. jum 7). Il-frekwenza ta' esponiment għal medium ġdid se tiddependi fuq l-istabbilità tas-sustanza kimika tat-test; jaf tkun meħtieġa frekwenza ogħla biex jinżammu konċentrazzjonijiet viċin għall-kostanti ta' sustanzi kimiċi volatili u mhux stabbli ħafna.

32. Ix-xenarju ta' esponiment permezz ta' applikatur tal-weraq (sprej) mhuwiex kopert f'dan il-metodu ta' ttestjar;

Kundizzjonijiet tat-test

33. Dawl fluworexxenti baxx u/jew qawwi għandu jintuża biex jipprovdi irradjanza tad-dawl fil-firxa ta' madwar 100-150 μE m^{-2} s^{-1} meta mkejjel bħala radjazzjoni attiva fotosintetika (400-700 nm) f'punti fl-istess distanza mis-sors tad-dawl bħall-qiegħ tar-reċipjenti tat-test (ekwivalenti għal ca. 6 000 to 9 000 lux) u bl-użu ta' ċiklu dawl-dlam ta' 16:8 h. Il-metodu ta' detezzjoni u kejl tad-dawl, b'mod partikolari t-tip ta' senser, sejjer jaffettwa l-valur imkejjel. Is-sensers sferiċi (li jirrispondu għad-dawl minn angoli 'l fuq u taħt il-pjan ta' kejl) u s-sensers "cosine" (li jirrispondu għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl) huma ppreferuti minn sensers unidirezzjonali, u ser jagħtu riżultati tal-qari ogħla, għal sors ta' dawl b'ħafna punti tat-tip deskritt hawnhekk.

34. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test għandha tkun ta' 23 ± 2 °C. Hija meħtieġa iktar attenzjoni f'każijiet speċjali bħal meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi mhux stabbli jew metalli; il-pH għandu jibqa' fil-medda 6-9. Ara (5) għal gwida ulterjuri.

Durata

35. It-test jintemm 14-il jum wara li l-pjanti jiġu trasferiti fir-reċipjenti tat-test.

Kejliet u determinazzjonijiet analitiċi

36. Fil-bidu tat-test, it-tul tar-rimja prinċipali tal-organiżmu tat-test huwa 2.5 cm (ara l-paragrafu 29); huwa mkejjel b'riga (ara l-Appendiċi 4) jew bl-analiżi tal-fotografija jew l-immaġni. It-tul tar-rimja prinċipali ta' organiżmu tat-test li jidher normali jew anormali għandu jiġi determinat fil-bidu tat-test, mill-inqas darba waqt il-perjodu tal-esponiment ta' 14-il ġurnata u fit-terminazzjoni tat-test. Nota: Bħala alternattiva għal dawk li m'għandhomx analiżi tal-immaġni, jekk il-workbench ikun sterilizzat qabel iż-żieda tal-pjanti fir-reċipjenti tat-test, riga sterili tista' tintuża wkoll biex jitkejjel it-tul tar-rimja prinċipali fil-bidu tat-test u waqt it-test. Bidliet fl-iżvilupp tal-pjanti, eż. fid-deformazzjoni tar-rimjiet, fid-dehra, fl-indikazzjoni tan-nekrożi, klorożi, fit-tkissir jew nuqqas ta' żamma fil-wiċċ u fit-tul u fid-dehra tal-għeruq, għandhom jiġu nnotati. Karatteristiċi sinifikanti tal-medium tat-test (eż. il-preżenza ta' materjal mhux maħlul, it-tkabbir tal-alka, fungi u batterji fir-reċipjent tat-test) għandhom jiġu nnotati.

37. Flimkien mad-determinazzjonijiet tat-tul tar-rimja prinċipali, l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq tlieta (jew aktar) mill-varjabbli tal-kejl li ġejjin għandhom jiġu evalwati wkoll:

i. Tul tal-fergħat laterali totali

ii. Tul tar-rimja totali

iii. Tul tal-għeruq totali

iv. Piż frisk

v. Piż xott

vi. Għadd ta sepali

▼M7

Nota 1: L-osservazzjonijiet magħmula waqt it-test tas-sejbien tal-medda jistgħu jgħinu fl-għażla tal-kejl addizzjonali rilevanti fost is-sitt varjabbli elenkati hawn fuq.

Nota 2: Id-determinazzjoni tal-piżijiet friski u xotti (parametri iv u v) hija mixtieqa ħafna.

Nota 3: Minħabba l-fatt li s-sukrosju u d-dawl (esponiment tal-għeruq għad-dawl waqt it-test) jista' jkollhom influwenza fuq it-trasportaturi tal-auxin (ormon tat-tkabbir tal-pjanti), u li ċerti sustanzi kimiċi jista' jkollhom mod ta' azzjoni tat-tip auxin, l-inklużjoni tal-punti tat-tmiem tal-għeruq (parametru iii) hija dubjuża.

Nota 4: Ir-riżultati tar-ring test juru koeffiċjenti għoljin tal-varjazzjoni (> 60 %) għat-tul totali tal-fergħa laterali (parametru i). It-tul totali tal-fergħa laterali huwa fi kwalunkwe każ inkluż fi ħdan il-kejl tat-tul tar-rimja totali (parametru ii) li juri koeffiċjenti aktar aċċettabbli tal-varjazzjoni ta' < 30 %.

Nota 5: B'riżultat mill-kunsiderazzjonijiet preċedenti, il-punti tat-tmiem prinċipali rakkomandati huma: tul totali tar-rimja, piż frisk u niexef (parametri ii, iv u v); parametru vi — numru ta' sepali — jitħalla għall-ġudizzju ta' min qed jesperimenta.

38. It-tul tar-rimja prinċipali u n-numru ta' sepali għandhom vantaġġ, fis-sens li jistgħu jkunu determinati għal kull reċipjent tat-test u tal-kontroll fil-bidu, waqt, u fl-aħħar tat-test bl-analiżi tal-fotografija u tal-immaġni, għalkemm riga (sterili) tista' tintuża wkoll.

39. Tul tal-fergħat laterali totali, tul tal-għeruq totali (bħala somma tal-fergħat jew għeruq totali kollha) u tul tar-rimja totali (bħala somma tat-tul tar-rimja prinċipali u t-tul tal-fergħat laterali totali) jistgħu jitkejlu b'riga fl-aħħar tal-esponiment.

40. Il-piż frisk u/jew niexef għandu jiġi determinat fil-bidu tat-test minn kampjun tar-rappreżentat tal-kultura ta' qabel ta' dak li se jintuża biex jinbeda t-test, fl-aħħar tat-test b'materjal tal-pjanti minn kull reċipjent tat-test u tal-kontroll.

41. It-tul tal-fergħat laterali totali, it-tul tar-rimja totali, it-tul tal-għeruq totali, il-piż frisk, il-piż niexef u n-numru ta' sepali jistgħu jiġu determinati kif ġej:

i. Tul tal-fergħat laterali totali: It-tul tal-fergħat laterali jista' jiġi determinat bil-kejl tal-feġħat laterali kollha b'riga fl-aħħar tal-esponiment. It-tul tal-fergħat laterali totali huwa s-somma tal-fergħat laterali kollha ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll.

ii. Tul tar-rimja totali: It-tul tar-rimja prinċipali jista' jiġu determinat bl-analiżi tal-immaġni jew bl-użu ta' riga. It-tul tar-rimja totali huwa s-somma tat-tul tal-fergħat laterali totali u t-tul tar-rimja prinċipali ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll fl-aħħar tal-esponiment.

iii. Tul tal-għeruq totali: It-tul tal-għeruq jista' jiġi determinat bil-kejl tal-għeruq kollha b'riga fl-aħħar tal-esponiment. It-tul tal-għeruq totali huwa s-somma tal-għeruq kollha ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll.

iv. Piż frisk: Il-piż frisk jista' jiġi determinat billi l-organiżmi tat-test jintiżnu fl-aħħar tal-esponiment. Il-materjal tal-pjanti ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll se jitlaħlaħ bl-ilma distillat, ixxuttat bil-mod bil-karta ċelluloża. Wara din il-preparazzjoni, il-piż frisk se jiġi determinat billi

▼M7

jintiżen. Il-bijomassa tal-bidu (piż frisk) hija determinata fuq il-bażi ta' kampjun tal-organiżmi tat-test meħud mill-istess lott użat biex jitlaqqmu r-reċipjenti tat-test.

v. Piż xott: Wara l-preparazzjonijiet għad-determinazzjoni tal-piż frisk, l-organiżmi tat-test se jiġu mnixxfin f'temperatura ta' 60 °C għal piż kostanti. Din il-massa hija l-piż niexef. Il-bijomassa tal-bidu (piż niexef) hija determinata fuq il-bażi ta' kampjun tal-organiżmi tat-test meħud mill-istess lott użat biex jitlaqqmu r-reċipjenti tat-test.

vi. Għadd ta sepali: Is-sepali kollha se jingħaddu tul ir-rimja prinċipali.

Frekwenza tal-kejl u determinazzjonijiet analitiċi

42. Jekk jintuża disinn ta' test statiku, għandu jitkejjel il-pH ta' kull trattament fil-bidu u fi tmiem it-test. Jekk jintuża disinn tat-test semistatiku, il-pH għandu jitkejjel f'kull lott ta' soluzzjoni tat-test "ġdid" qabel kull tiġdid u anki fis-soluzzjonijiet korrispondenti "użati"

43. L-intensità tad-dawl għandha titkejjel fil-kamra tat-tkabbir, fl-inkubatur jew fi kmamar f'punti fl-istess distanza mis-sors tad-dawl bħall-organiżmi tat-test. Il-kejliet għandhom isiru tal-inqas darba matul it-test. It-temperatura tal-medium fil-kontenitur sostitwit miżmum fl-istess kundizzjonjiet tal-kamra ta' tkabbir, inkubatur jew kamra għandhom jiġu rreġistrati mill-inqas darba kuljum (jew kontinwament b'logger tad-dejta).

44. Waqt it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika (sustanzi kimiċi) tat-test jiġu determinati f'intervalli xierqa. F'testijiet statiċi, ir-rekwiżit minimu huwa li jiġu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet fil-bidu u fi tmiem it-test.

45. F'testijiet semistatiċi fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika (sustanzi kimiċi) mhumiex mistennija li jibqgħu fi ħdan l-± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, huwa meħtieġ li jiġu analizzati s-soluzzjonijiet tat-test ippreparati friski u l-istess soluzzjonijiet f'kull tiġdid. Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjonijiet inizjali mkejla tas-sustanza kimika (sustanzi kimiċi) tat-test mhumiex fi ħdan l-± 20 % tan-nominali iżda fejn tista' tiġi pprovduta evidenza suffiċjenti biex turi li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (jiġifieri fi ħdan il-medda ta' 80 — 120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitwettqu biss fuq l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tat-test qabel it-tiġdid għandhom biss isiru fuq reċipjent replikat wieħed f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tar-reċipjenti miġbura skont ir-replika).

46. Jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tat-test inżammet b'mod sodisfaċenti fi ħdan l-± 20 % tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, l-analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla mhix fi ħdan l-± 20 %, l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja ġeometrika waqt l-esponiment jew mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (5).

Test tal-limitu

47. Taħt ċertu ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza kimika tat-test m'għandha l-ebda effett tossiku f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu tas-solubbiltà tagħha fil-medium tat-test jew fil-każ ta' formulazzjoni sal-limitu tad-dispersibbiltà, jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi paragun tar-risposti fi grupp tal-kontroll u fi grupp tat-trattament wieħed (100 mg/l jew konċentrazzjoni ugwali għal-limitu tas-solubbiltà). Huwa rrakkomandat

▼M7

ħafna li dan ikun appoġġjat bl-analiżi tal-konċentrazzjoni tal-esponiment. Japplikaw il-kundizzjonijiet tat-test u l-kriterji ta' validità deskritti preċedentement kollha għal test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li n-numru ta' repliki tat-trattament għandu jiġi dduplikati. It-tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-media, eż. Test-t ta' Student.

DATA U RAPPORTAR

Varjabbli ta' rispons

48. L-iskop tat-test huwa li jiddetermina l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv tal-*Myriophyllum spicatum*. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli tar-rispons.

a) Rata ta' tkabbir speċifika medja: Dan il-varjabbli tar-rispons huwa kkalkulat fuq il-bażi ta' tibdil fil-logarittmi tat-tul tar-rimja prinċipali, u barra minn hekk, fuq il-bażi ta' tibdil fil-logarittmi ta' parametru tal-kejl oħrajn, jiġifieri it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru ta' sepali matul iż-żmien (espressi bħala ġranet) fil-kontrolli u f'kull grupp tat-trattament. Nota: Għall-parametru tal-kejl it-tul tal-fergħat laterali totali u t-tul tal-għeruq totali, mhux possibbli kalkolu tar-rata medja speċifika tat-tkabbir. Fil-bidu tat-test, l-organiżmu tat-test m'għandu l-ebda fergħa laterali u l-ebda għeruq (abbażi tal-preparazzjoni mill-kultura ta' qabel); meta tibda mill-valur żero, il-kalkolu tar-rata tat-tkabbir speċifika medja mhux definit.

b) Rendiment: Dan il-varjabbli tar-rispons huwa kkalkulat fuq il-bażi ta' tibdil fit-tul tar-rimja prinċipali, u barra minn hekk, fuq il-bażi ta' tibdil f'parametri tal-kejl oħra — jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru ta' sepali, u parametri oħra jekk jitqiesu utli — fil-kontrolli u f'kull grupp tat-trattament sal-aħħar tat-test.

49. Stimi tat-tossiċità għandhom ikunu bbażati fuq it-tul tar-rimja prinċipali u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef, in-numru ta' sepali, ara l-paragrafu 37 u n-Noti 2, 4 u 5 ta' dan il-paragrafu), minħabba li ċertu sustanzi kimiċi jaffettwaw varjabbli oħra tal-kejl ħafna aktar mit-tul tar-rimja prinċipali. Dan l-effett ma jiġix rivelat bil-kalkolu tat-tul tar-rimja biss.

Rata ta' tkabbir speċifika medja

50. Ir-rata tat-tkabbir speċifiku medju għal perjodu speċifiku hija kkalkulata bħala ż-żieda logaritmika fil-varjabbli tat-tkabbir — tul tar-rimja prinċipali u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali (jiġifieri it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru tas-sepali) — bl-użu tal-formula t'hawn taħt għal kull replikazzjoni tal-kontroll u t-trattamenti:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

fejn:

μ_{i-j}: rata ta' tkabbir speċifika medja mill-ħin i sa j

N_i: varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'ħin i

N_j: varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'ħin j

t: perjodu ta' ħin minn i sa j

▼M7

Għal kull grupp ta' trattament u kull grupp ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza.

51. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għandha tiġi kkalkolata għall-perjodu ta' ttestjar kollu (il-ħin "i" fil-formola ta' hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-ħin "j" huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir speċifika medja flimkien mal-istimi tal-varjanza. Barra minn hekk, għandha tiġi vvalutata r-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni sabiex jiġu evalwati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test li jseħħu matul il-perjodu ta' esponiment (eż.. billi jiġu spezzjonati l-kurvi ta' tkabbir ittrasformati mil-log).

52. Perċentwal ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir (I_r) jista' jiġi kkalkulat fuq kull konċentrazzjoni tat-test (grupp ta' trattament) bil-formula li ġejja:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

fejn:

% Ir: perċentwal ta' inibizzjoni f'rata medja ta' tkabbir speċifiku

μC: valur medju għal μ fil-kontroll

μT: valur medju għal μ fil-grupp tat-trattament

Rendiment

53. Effetti fuq ir-rendiment huma determinati fuq il-bażi tat-tul tar-rimja prinċipali tal-varjabbli tal-kejl u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru tas-sepali) preżenti f'kull reċipjent tat-test fil-bidu u fl-aħħar tat-test. Għall-piż frisk jew piż niexef, il-bijomassa tal-bidu hija determinata fuq il-bażi ta' kampjun tal-organiżmi tat-test meħud mill-istess lott użat biex jitlaqqmu r-reċipjenti tat-test. Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkula valur medju għar-rendiment flimkien mal-istimi tal-varjanza. Il-perċentwal medju fir-rendiment (% I_y) jista' jiġi kkalkulat għal kull grupp tat-trattament kif ġej:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

fejn:

% Iy: tnaqqis perċentwali fir-rendiment

bC: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għall-grupp ta' kontroll

bT: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu fil-grupp ta' trattament

Ħin għall-irdoppjar

54. Biex jiġi ddeterminat il-ħin tal-irduppjar (T_d) tat-tul tar-rimja prinċipali u l-aderenza għal dan il-kriterju tal-validità (ara l-paragrafu 8), il-formula li ġejja hija użata bid-dejta miksuba mir-reċipjenti tal-kontroll:

$T_d = \ln 2/\mu$

Fejn μ hija r-rata speċifika tat-tkabbir medja determinata kif deskritt fil-paragrafi 50-52.

▼M7

Ipplottjar tal-kurvi konċentrazzjoni-rispons

55. Il-kurvi tal-konċentrazzjoni-rispons li għandhom x'jaqsmu mal-inibizzjoni tal-perċentwal medju tal-varjabbli tar-rispons (I_r, jew I_y ikkalkulat kif jidher fil-paragrafu 53) u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu pplottjati.

Stimi tal-EC_x

56. Stimi tal-EC_x għandhom ikunu bbażati kemm fuq ir-rata speċifika tat-tkabbir medja (E_rC_x) kif ukoll ir-rendiment (E_yC_x), li kull wieħed minnhom għandu mbagħad ikun ibbażat fuq it-tul tar-rimja prinċipali, u possibbilment varjabbli tal-kejl addizzjonali (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru tas-sepali). Dan minħabba li hemm sustanzi kimiċi li jagħmlu impatt fuq it-tul tar-rimja prinċipali u varjabbli tal-kejl oħrajn b'mod differenti. Il-parametri ta' tossiċità mixtieqa huma għalhekk erba' valuri EC_x għal kull livell ta' inibizzjoni kkalkulat: E_rC_x (tul tar-rimja prinċipali); E_rC_x (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef, jew in-numru tas-sepali); E_yC_x (tul tar-rimja prinċipali); E_yC_x (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef, jew in-numru tas-sepali);

57. Għandu jiġi nnotat li l-valuri EC_x ikkalkulati bl-użu ta' dawn il-varjabbli tar-rispons mhumiex komparabbli u din id-differenza hija rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq ir-rata tat-tkabbir speċifika medja (E_rC) fil-maġġoranza tal-każi se jkunu ogħla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) — jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-metodu ta' ttestjar huma osservati — minħabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Din id-differenza m'għandhiex tkun interpretata bħala differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli tar-rispons, iżda sempliċiment li l-valuri huma differenti matematikament.

Proċeduri ta' statistika

58. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analiżi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ponderata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-data dwar ir-rispons — eż. ma' modelli probit jew logit jew Weibull (7), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli fid-dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet uniformi. Meta jkunu viċin iż-żero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistgħu jitkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analiżi (7). Għandu jiġi nnotat li l-metodi standard tal-analiżi li jużaw it-trasformazzjonijiet probit, logit jew Weibull huma maħsuba għall-użu fuq id-data kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u għandhom jiġu modifikati biex jakkomodaw ir-rata tat-tkabbir jew irendu d-dejta. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni tal-valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinsabu f'(8) (9) (10).

59. Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x. Fejn ikun possibbli, għandhom jiġu stmati l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għal kull stima. It-tjubija tad-dwar ir-rispons tad-dejta għall-mudell ta' rigressjoni għandha tiġi vvalutata grafikament jew statistikament. L-analiżi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament.

60. Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (10), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibli m'humiex xierqa għad-dejta.

61. Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa meħtieġ li jitqabblu l-medji ta' trattament permezz ta' analiżi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni mbagħad titqabbel mal-medja tal-kontroll bl-użu ta' metodu ta' ttestjar ta' paragun multipli jew tax-xejriet xieraq. It-testijiet Dunnett jew Williams jistgħu jkunu utli (12) (13) (14) (15) (16). Huwa meħtieġ li jiġi vvalutat jekk treġġix is-suppożizzjoni tal-omoġeneità ta'

▼M7

varjanza ta' ANOVA. Din il-valutazzjoni tista' titwettaq grafikament jew b'test formali (15). Testijiet xierqa huma Levene jew Bartlett. Jekk is-suppożizzjoni ta' omoġeneità tal-varjanzi ma tkunx issodisfata, din kultant tista' tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, għandha tiġi kkunsidrata analiżi b'metodi bħat-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere. F'(10) tista' tinstab gwida addizzjonali dwar id-determinazzjoni tal-NOEC.

62. Żviluppi xjentifiċi riċenti wasslu għal rakkomandazzjoni biex jiġi abbandunat il-kunċett tal-NOEC u minflok jinbidel bi stimi EC_x ta' punti bbażati fuq regressjoni. Ma ġiex stabbilit valur xieraq għal x għal dan it-test *Myriophyllum*. Madankollu, firxa ta' 10 sa 20 % tidher xierqa (jiddependi fuq il-varjabbli tar-rispons magħżul), u preferibbilment kemm l-EC_{10} u l-EC_{20} u l-limiti tal-kunfidenza tagħhom għandhom jiġu rappurtati.

Ir-rapportar

63. Ir-rapport tat-test jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test

Sustanza monokostitwenti:

— dehra fiżika, solubbiltà fl-ilma, u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impuritajiet bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

Sustanza multikostitwenti, UVCBs jew taħlita:

— karatterizzati kemm jista' jkun bl-identità kimika (ara hawn fuq), okkorrenza kwantitattiva u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test

— L-isem xjentifiku u s-sors.

Kundizzjonijiet tat-test

— Il-proċedura tat-test użata (statika jew semistatika).

— Id-data tal-bidu tat-test u d-durata tiegħu.

— Medium tat-test

— Deskrizzjoni tad-disinn sperimentali: reċipjenti u għotjien tat-test, volumi tas-soluzzjoni, it-tul tar-rimja prinċipali għal kull reċipjent tat-test fil-bidu tat-test.

— Il-konċentrazzjonijiet tat-test (nominali u mkejla kif xierqa) u n-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni.

— Metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u tat-test inkluż l-użu ta' kwalunkwe solvent jew aġent dispersiv.

— It-temperatura matul it-test.

— Is-sors tad-dawl, l-intensità tad-dawl u l-omoġenità.

— Il-valuri tal-pH tal-media tat-test u ta' kontroll.

— Il-metodu tal-analiżi tas-sustanza kimika tat-test bid-dejta tal-valutazzjoni ta' kwalità xierqa (studji tal-validazzjoni, devjazzjonijiet standard jew limiti tal-kunfidenza ta' analiżijiet).

▼M7

— Metodi għad-determinazzjoni tat-tul tar-rimja prinċipali u varjabbli tal-kejl oħrajn, eż. tul tal-fergħat laterali totali, tul tar-rimja totali, tul tal-għeruq totali, piż frisk, piż niexef jew numru tas-sepali.

— L-istat tal-kultura (sterili jew mhux sterili) ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll f'kull osservazzjoni.

— Id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-metodu ta' ttestjar.

Riżultati

— Dejta mhux ipproċessata: tul tar-rimja prinċipali u varjabbli tal-kejl oħrajn f'kull reċipjent tat-test u tal-kontroll f'kull osservazzjoni u okkażjoni tal-analiżi.

— Medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta' kejl;

— Kurvi tat-tkabbir għal kull varjabbli tal-kejl.

— Il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki.

— Rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett.

— Stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi għal varjabbli ta' rispons eż. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikunu kkalkolati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom.

— Jekk tintuża ANOVA, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. id-differenza l-inqas sinifikanti).

— Kwalunkwe stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament.

— Kwalunkwe sinjal viżiva tal-fitotossiċità kif ukoll l-osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test.

— Diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

TAGĦRIF

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(3) Il-Kapitolu C.26 ta' dan l-Anness*: Lemna sp. Test tal-Inibizzjoni mit-Tkabbir,*.

(4) OECD (2014), "*Myriophyllum spicatum* Test tat-Tossiċità: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Serje dwar l-Ittestjar u l-Evalwazzjoni, Nru 205, Pubblikazzjoni OECD, Paris.

(5) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(6) Il-Kapitolu C.51 ta' dan l-Anness: Water-Sediment *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(10) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Bijomassa hija l-piż frisk u/jew niexef ta' materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test il-bijomassa hija s-somma tar-rimja prinċipali, tal-fergħat laterali kollha u tal-għeruq kollha.

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita.

Klorożi hija l-bidla tal-kulur minn aħdar għal sfurija tal-organiżmu tat-test speċjalment tas-sepali.

EC_x huwa l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test maħlula fil-medium tat-test li jirriżulta fi tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir tal- *Myriophyllum spicatum* f'perjodu ta' esponiment ddikjarat (li għandu jissemma espliċitament jekk ivarja mid-durata tat-test sħiħ jew normali). Biex tindika mingħajr ambigwità valur EC li jiġi derivat minn rata tat-tkabbir, is-simbolu "E_rC" jintuża għar-rata tat-tkabbir u "E_yC" jintuża għar-rendiment, segwit mill-varjabbli tal-kejl użat, eż. E_rC (tul tar-rimja prinċipali).

It-**tkabbir** huwa żieda fil-varjabbli tal-kejl, eż. tul tar-rimja prinċipali, l-ammont tal-fergħat laterali totali, it-tul tar-rimja totali, it-tul tal-għeruq totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru ta' sepali matul il-perjodu tat-test.

Ir-**rata tat-tkabbir** (rata ta' tkabbir speċifika medja) hija ż-żieda logaritmika fil-varjabbli tal-kejl waqt il-perjodu tal-esponiment. *Nota*: Il-varjabbli tar-rispons relatati mar-rata tat-tkabbir huma indipendenti mid-durata tat-test sakemm il-mudell tat-tkabbir ta' organiżmi tal-kontroll mhux esposti huwa esponenzjali.

Il-**Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC)** hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir (b'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'ħin ta' esponiment partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett ta' ħsara ugwali jew ogħla minn dawk osservati fil-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jistgħux jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni dettaljata għal kif il-LOEC (u b'hekk in-NOEC) intgħażlet.

Varjabbli tal-kejl huma kwalunkwe tip ta' varjabbli li huma mkejla biex jesprimu l-punt tat-tmiem tat-test bl-użu ta' wieħed jew aktar varjabbli tar-rispons differenti. F'dan il-metodu ta' ttestjar it-tul tar-rimja prinċipali, it-tul tal-fergħat laterali totali; it-tul tar-rimja prinċipali, it-tul tal-għeruq totali, il-piż frisk, il-piż xott u n-numru ta' sepali huma varjabbli tal-kejl.

Monokultura hija kultura bi speċi ta' pjanta waħda.

Nekrożi huwa tessut mejjet (jiġifieri abjad jew kannella skur) tal-organiżmu tat-test.

Il-**Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC)** hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taħt l-LOEC.

Varjabbli tar-rispons huwa varjabbli għall-istima tat-tossiċità derivata minn kwalunkwe varjabbli mkejjel li jiddeskrivi l-bijomassa b'metodi differenti tal-kalkolu. Għal dan il-metodu ta' ttestjar, ir-rata tat-tkabbir u r-rendiment huma varjabbli tar-rispons derivati minn varjabbli tal-kejl bħat-tul tar-rimja prinċipali, tul tar-rimja totali, piż frisk, piż niexef jew numru ta' sepali.

Test semistatiku (tiġdid) huwa test fejn is-soluzzjoni tat-test tiġi sostitwita perjodikament f'intervalli speċifiċi matul it-test.

▼M7

Test statiku huwa metodu ta' ttestjar mingħajr tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew taħlita li tiġi ttestjata billi jintuża dan il-metodu ta' ttestjar

Punt ta' tmiem tat-test jiddeskrivi l-fattur ġenerali li jinbidel b'mod relattiv għall-kontroll mis-sustanza kimika tat-test bħala mira tat-test. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-punt ta' tmiem tal-ittestjar hija l-inibizzjoni li tista' tiġi espressa b'varjabbli ta' rispons differenti li huma bbażati fuq varjabbli ta' kejl wieħed jew iktar.

Medium tat-test huwa medium ta' tkabbir sintetiku komplut li fuqu jikbru l-pjanti tal-ittestjar meta esposti għas-sustanza kimika tat-test. Is-sustanza kimika tat-test tinħall fil-medium tat-test.

UVCB hija sustanza ta' kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodott ta' reazzjoni kumplessa jew materjal bijoloġiku

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex tiġi espressa l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' esponiment li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' esponiment. Nota: Meta l-mudell tat-tkabbir ta' organiżmi mhux esposti huwa esponenzjali, il-varjabbli tar-rispons ibbażati fuq ir-rendiment se jonqsu matul id-durata tat-test.

▼M7

Appendiċi 2

ANDREWS MODIFIKAT GĦALL-KULTURA TAL-ĦAŻNA U TA' QABEL IL-ĦAŻNA

Minn ħames soluzzjonijiet tal-ħażna tan-nutrijent ippreparati separatament il-medium Andrews modifikat għall-kultura tal-ħażna u l-kultura ta' qabel il-ħażna se jiġi ppreparat, biż-żieda ta' 3 % sukrożju.

Tabella 1

Kompożizzjoni tas-soluzzjoni tan-nutrijent Andrews: (Dežinjazzjoni ASTM E 1913-04)

Il-produzzjoni ta' soluzzjonijiet tal-ħażna tan-nutrijent			Il-produzzjoni ta' soluzzjoni tan-nutrijent
Soluzzjoni tal-ħażna	Sustanza Kimika	Piż inizjali għal kull 1000 ml	ml għal kull 5 l soluzzjoni tan-nutrijent
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Ara hawn taħt soluzzjoni tal-ħażna 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Is-soluzzjonijiet tal-ħażna jistgħu jinżammu fi friġġ għal 6 xhur (f'temperatura ta' 5-10 °C). Hija biss is-soluzzjoni tal-ħażna Nru. 5 li għandha ħajja fuq l-ixkaffa mnaqqsa (xahrejn).

Tabella 2

Produzzjoni tas-soluzzjoni tal-ħażna 3.1 għall-preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-ħażna 3

Sustanza Kimika	Piż inizjali ta' g/100 ml
$MnSO_4 * 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 * 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 * 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} * 4\ H_2O$	0,0037

Wara li tipproduċi s-soluzzjoni tal-ħażna 3,1 (Tabella 2), iffriża malajr din is-soluzzjoni fi 11 ml alikwoti (f'temperatura ta' – 18 °C mill-inqas). Il-porzjonijiet iffriżati malajr għandhom żmien tal-ħżin ta' ħames snin.

Biex tipproduċi soluzzjoni tal-ħażna 3, neħħi mill-friża s-soluzzjoni tal-ħażna 3,1, ilma 10 ml minnu fi flixkun volumetriku ta' 1 l u żid ilma pur ħafna sal-marka tal-flixkun.

Biex tikseb medium Andrews modifikat, imla madwar 2 500 ml ilma pur ħafna ġo flixkun volumetriku 5 l. Wara li żżid 50 ml ta' kull soluzzjoni tal-ħażna, imla 90 % tal-flixkun volumetriku b'ilma pur ħafna u tagġusta l-pH għal 5,8.

▼M7

Wara dan, żid 150 g sukrożju maħlul (3 % għal kull 5 l); imbagħad, żid il-flixkun volumetriku b'ilma pur ħafna sal-marka. Finalment, is-soluzzjoni tan-nutrijent timtela fil-fliexken Schott ta' 1 l u maqsuma f'temperatura ta' 121 °C għal 20 minuta.

Is-soluzzjoni tan-nutrijenti prodotta tista' tinżamm sterili fi friġġ (f'temperatura ta' 5-10 °C) għal tliet xhur.

Medium Andrews modifikat għal test tat-tossiċità ħieles mis-Sediment

Mis-soluzzjonijiet tal-ħażna ta' ħames nutrijenti diġà msemmija fit-Tabelli 1 u 2, medium Andrews modifikat ikkonċentrat għal għaxar darbiet meħtieġ biex jinkisbu s-soluzzjonijiet tat-test se jkunu ppreparati, biż-żieda ta' 30 % sukrożju. Biex tagħmel dan, imla madwar 100 ml ilma pur ħafna ġo flixkun volumetriku 1 l. Wara li żżid 100 ml ta' kull wieħed mis-soluzzjonijiet tal-ħażna, aġġusta l-pH għal 5,8. Wara dan, żid 30 % tas-sukrożju maħlul (300 g għal kull 1 000 ml); imbagħad, żid il-flixkun volumetriku b'ilma pur ħafna sal-marka.

Finalment, is-soluzzjoni tan-nutrijent timtela fil-fliexken Schott ta' 0,5 l u maqsuma f'temperatura ta' 121 °C għal 20 minuta.

Is-soluzzjoni tan-nutrijenti konċentrata għal għaxar darbiet prodotta tista' tinżamm sterili fi friġġ (f'temperatura ta' 5-10 °C) għal tliet xhur.

▼M7

Appendiċi 3

ŻAMMA TAL-KULTURA TAL-ĦAŻNA

F'din l-Appendiċi 3, il-kultura tal-ħażna *Myriophyllum spicatum* L ([1]), dikotiledonu akwatiku mgħarraq, ħija deskritta speċi tal-ħaxixa tal-morliti tal-ilma. Bejn Ġunju u Awwissu, fjuri roża-bojod moħbija jisporġu minn fuq il-wiċċ tal-ilma. Il-pjanti huma miżrugħin fl-art permezz ta' sistema ta' riżomi robusti u jistgħu jinstabu fl-emisfera tat-tramuntana kollha f'ilmijiet kalmi ewtrofiċi, iżda mhux imniġġsa u aktar kalċiferi b'sottostrat tat-tajn. Il-*Myriophyllum spicatum* jippreferi l-ilma frisk, iżda jinsab fl-ilma salmastru wkoll.

Għall-kultura tal-ħażna ħielsa mis-sediment taħt kundizzjonijiet tal-laboratorju, huma meħtieġa pjanti sterili. Pjanti sterili huma disponibbli mil-laboratorju tal-ekotossikoloġija tal-Umweltbundesamt Ġermaniż (Aġenzija Federali Ambjentali tal-Ġermanja).

Inkella, l-organiżmi tat-test jistgħu jiġu ppreparati minn pjanti mhux sterili skont id-dežinjazzjoni ASTM E 1913-04. Ara hawn taħt — estratt mill-Gwida Standard ASTM — il-proċedura għall-ikkulturar tal-*Myriophyllum sibiricum* miġbur mill-post:

> "Jekk tibda mill-post fejn miġbura, pjanti mhux sterili, iġbor il-blanzuni tal-*M. sibiricum* fil-ħarifa. Poġġi l-blanzuni f'akwarju ta' 20 l li fih 5 cm sediment sterili li huwa mgħotti bir-ramel silica jew pereżempju bit-Turface® u 18 l ta' ilma reaġent. Qalleb l-akwarju u żomm f'temperatura ta' 15 °C u rata tal-fluenza ta' 200 sa 300 μmol m^{-2} s^{-1} għal 16-il siegħa fil-ġurnata. Il-kultura tal-pjanti fl-akwarju tista' tinżamm bħala sors ta' riżerva ta' pjanti fil-każ li l-kulturi tal-pjanti sterili jinqerdu b'malfunzjoni mekkanika fil-kabinett tat-tkabbir, bil-kontaminazzjoni jew xi raġuni oħra. Il-pjanti mkabbra fl-akwarju mhumiex sterili u kulturi sterili ma jistgħux jinżammu f'sistema tal-kultura tal-lott. Biex tiġi sterilizzata l-kultura, il-pjanti jitneħħew mill-akwarju u jitlaħalħu taħt ilma ġieri dejonizzat għal madwar nofs siegħa. Taħt kundizzjonijiet asettiċi f'kabinett tal-arja laminari, il-pjanti huma dižinfettati għal inqas minn 20 minuta (sakemm il-maġġoranza tat-tessut tal-pjanta jiġi bbliċjat u l-apiċi li qed tikber tibqa' ħadra) f'soluzzjoni ta' 3 % (w/v) tas-sodju ipokloritu li fiha 0,01 % tal-aġent tensjoattiv xieraq. Ħawwad id-dižinfettant u l-materjal tal-pjanti. Segmenti b'diversi nodi huma trasferiti f'tubi tal-kulturi sterili li fihom 45 ml medium Andrews sterilizzat u modifikat u magħluqa b'għeluq tat-tubu tal-kultura sempliċi. Segment tal-pjanti wieħed biss jitpoġġa f'kull kompartiment tat-test. Film tal-issiġillar tal-laboratorju jintuża biex jiżgura l-għeluq lir-reċipjent tal-kultura. Ladarba tkun ġiet stabbilita kultura sterili, is-segmenti tal-pjanti li fihom bosta nodi għandhom jiġu ttrasferiti fil-kompartimenti tat-test ġodda li jkun fihom midja tan-nutrijenti likwida friska kull għaxar sa tnax-il ġurnata. Kif muri bl-ikkulturar fuq il-plates tal-agar, il-pjanti għandhom ikunu sterili u jibqgħu sterili għal tmien ġimgħat qabel jista' jinbeda l-ittestjar."

Peress li l-medium Andrews modifikat fih is-sukroża (li jistimula t-tkabbir tal-fungi u tal-batterji), il-materjali, soluzzjonijiet u l-ikkulturar kollha għandhom isiru taħt kundizzjonijiet sterili. Il-likwidi kollha kif ukoll it-tagħmir huma sterilizzati qabel l-użu. L-isterilizzazzjoni ssir permezz ta' trattament tal-arja msaħħna (210 °C) għal 4 sigħat jew awtoklava għal 20 minuta f'121 °C. Barra minn hekk, il-flasks, dixxijiet, skutelli, eċċ. kollha u tagħmir ieħor jgħaddu minn trattament tal-fjamma fuq workbench sterili eżatt qabel l-użu.

Kulturi tal-ħażna jistgħu jinżammu taħt illuminazzjoni u temperatura mnaqqsaμE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) għal ħinijiet itwal mingħajr il-bżonn li jerġgħu jiġu stabbiliti. Il-medium tat-tkabbir *Myriophyllum* għandu jkun l-istess bħal dak użat għall-ittestjar iżda midja oħra rikka fin-nutrijenti tista' tintuża għall-kulturi tal-ħażna.

([1]) Carl von Linné (* it-23 ta' Mejju 1707 f' Råshult /Älmhult; † l-10 ta' Jannar 1778 f' Uppsala).

▼M7

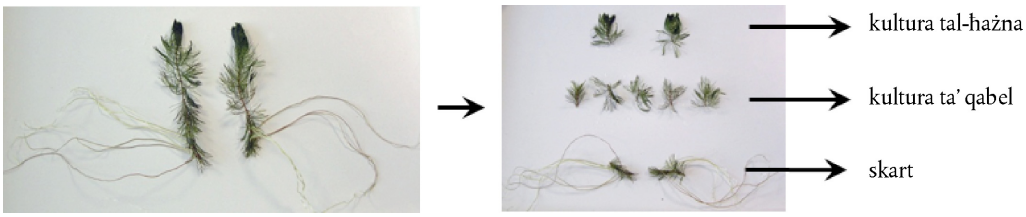
Is-segmenti tal-pjanti huma distribwiti assenikament f'diversi fliexken tal-500 ml Erlenmeter u/jew 2 000 ml Fernbach, kull wieħed mimli b'madwar 450 u rispettivament 1 000 ml medium Andrews modifikat. Imbagħad, il-fliexken isirilhom plagg bit-tapp assenikament ċelluloż.

Barra minn hekk, it-trattament bil-fjamma ta' tagħmir fil-workbench sterili eżatt qabel l-użu huwa assolutament neċessarju. Skont in-numru u d-daqs, il-pjanti għandhom jiġu trasferiti fis-soluzzjoni tan-nutrijent friska madwar kull tliet ġimgħat.

Jistgħu jintużaw apiċi kif ukoll segmenti tal-parti tan-nofs taz-zokk għal din il-kultura mġedda. In-numru u d-daqs tal-pjanti trasferiti (jew tas-segmenti tal-pjanti) jiddependi fuq kemm huma meħtieġa pjanti. Pereżempju, tista' tittrasferixxi ħames segmenti tar-rimja fi flixkun Fernbach wieħed u tliet segmenti tar-rimja fi flixkun Erlenmeyer wieħed, kull waħda b'tul ta' 5 cm. Armi kwalunkwe partijiet bl-għeruq, bil-fjuri, mejta jew li jkunu evidenti b'xi mod jew ieħor.

Figura 1

Il-qtugħ tal-pjanti għall-ħażna u l-kultura ta' qabel wara 3 ġimgħat tal-kultivazzjoni.



Il-kultura tal-pjanti għandha titwettaq fi fliexken tal-500 ml Erlenmeyer u fil-fliexken tal-2 000 ml Fernbach f'inkubatur li jkessaħ f'temperatura ta' 20 ± 2 °C b'dawl kontinwu f'madwar 100-150 µE m^{-2} s^{-1} jew 6 000-9 000 Lux (emess minn illuminazzjoni tal-kompartiment bil-kulur tat-temperatura "dawl abjad baxx").

Figura 2

Il-kultura tal-pjanti f'inkubatur li jkessaħ b'kompartiment tal-illuminazzjoni.



Għandhom jintużaw reċipjenti tal-kulturi tal-ħġieġ kimikament nodfa (maħsula bl-aċidu) u sterilizzati kif ukoll tekniki ta' mmanniġġar asettiċi. Fil-każ ta' kontaminazzjoni tal-kultura tal-ħażna eż. bl-alka, fungi u/jew batterji, kultura ġdida għandha tiġi ppreparata jew kultura tal-ħażna minn laboratorju għandha tintuża biex tiġġedded waħda mill-kulturi.

▼M7

Appendiċi 4

MANUTENZJONI TAL-KULTURA TA' QABEL U PREPARAZZJONI TAL-ORGANIŻMU TAT-TEST GĦALL-ITTESTJAR

Biex tikseb kultura ta' qabel, aqta r-rimjiet mill-kultura tal-ħażna f'segmenti b'żewġ sepali kull wieħed; poġġi s-segmenti fil-fliexken Fernbach mimlija b'medium Andrews modifikat (bi 3 % sukrożju). Kull flixkun jista' jkollu sa 50 segment tar-rimja. Madankollu, għandha tingħata attenzjoni li s-segmenti huma vitali u m'għandhom l-ebda għeruq u fergħat laterali fuq il-blanzuni (ara l-figura 1 fl-Appendiċi 3).

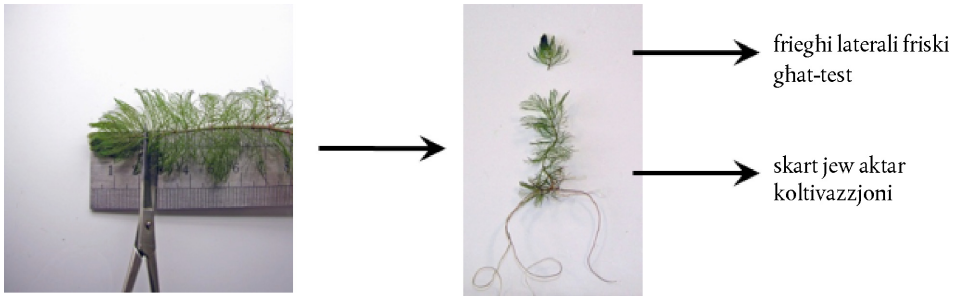
L-organiżmi tal-kultura ta' qabel huma kkulturati għal 14 sa 21 ġurnata taħt kundizzjonijiet sterili f'kompartiment ambjentali b'fażijiet li jalternaw id-dawl/dlam ta' 16/8 sigħat. Intensità tad-dawl magħżula mill-firxa ta 100-150 μE m^{-2} s^{-1}. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test għandha tkun ta' 23 ± 2 °C.

Peress li l-medium Andrews modifikat fih is-sukrosju (li jistimula t-tkabbir tal-fungi u l-batterji), għandhom jiġu ppreparati soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u l-ikkulturar għandu jsir taħt kundizzjonijiet sterili. Il-likwidi kollha kif ukoll it-tagħmir huma sterilizzati qabel l-użu. L-isterilizzazzjoni ssir permezz ta' trattament tal-arja msaħħna (210 °C) għal 4 sigħat jew awtoklava għal 20 minuta f'121 °C. Barra minn hekk, il-flasks, dixxijiet, skutelli, eċċ. kollha u tagħmir ieħor jgħaddu minn trattament tal-fjamma fuq workbench sterili eżatt qabel l-użu.

Rimjiet huma mneħħija b'mod asseniku mill-fliexkien tal-kultura ta' qabel, bl-għażla ta' materjal li huwa omoġenju kemm jista' jkun. Kull test jeħtieġ mill-inqas 60 organiżmu tat-test (l-ittestjar bi tmien konċentrazzjonijiet kimiċi tat-test). Għall-ittestjar, aqbad frieħi laterali friski minn kulturi ta' qabel, qassarhom għal 2,5 cm mill-bażi (bl-użu ta' riga) u ttrasferihom għal beaker li fih medium Andrews modifikat sterili. Dawn il-frieħi laterali friski jistgħu jintużaw għat-test tat-tossiċità ħieles mis-sediment *Myriophyllum spicatum*.

Figura 2

Qtugħ tal-pjanti minn pre-kultura għat-test tat-tossiċità ħieles mis-sediment *Myriophyllum spicatum*.



▼M7

C.51. MYRIOPHYLLUM SPICATUM TAS-SEDIMENT TAL-ILMA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linji gwida tat-test tal-OECD 239 (2014). Metodi tat-test huma disponibbli għall-pjanta li tibqa' f'wiċċ l-ilma, monokotiledonja akwatika, *Lemna* speċi (1) u għall-alka speċi (2). Dawn il-metodi normalment jintużaw biex jiġġeneraw dejta biex jindirizzaw ir-riskju tas-sustanzi kimiċi tat-test, b'mod partikolari sustanzi kimiċi b'attività erbiċidali, għal speċi ta' pjanti akwatiċi mhux fil-mira. Madankollu, f'ċertu każijiet, tista' tkun meħtieġa dejta għal speċi makrofiti addizzjonali. Gwida riċenti ppubblikata mill-workshop tas-Soċjetà għat-Tossikoloġija u l-Kimika Ambjentali (SETAC) dwar il-Valutazzjoni tar-Riskju tal-Makrofiti Akwatiċi għall-Pestiċidi (AMRAP) ipproponiet li d-dejta għal speċi makrofiti tal-għeruq jistgħu jkunu meħtieġa għas-sustanzi kimiċi tat-test fejn il-*Lemna* u l-alki huma magħrufa li ma jkunux sensittivi għall-mod ta' azzjoni jew jekk il-qsim tas-sediment huwa ta' tħassib, iwassal għal esponiment permezz tal-assorbiment tal-għeruq (3). Abbażi tal-għarfien u l-esperjenza attwali, *Myriophyllum* spp intgħażlu bħala l-ispeċi ppreferuta f'każijiet fejn id-dejta hija meħtieġa għal speċi ta' taħt l-ilma, dikotiledoni bl-għeruq (4) (5) (6). Dan it-test ma jissostitwixxix testijiet tat-tossiċità akwatika oħrajn; minflok dan għandu jikkumplimentahom sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni aktar kompleta tal-periklu akwatiku tal-pjanti u tar-riskju. Il-metodu ta' ttestjar tas-sediment tal-ilma *Myriophyllum spicatum* jikkumplimenta t-Test tat-Tossiċità tas-sediment tal-ilma *Myriophyllum spicatum* (7).

2. Dan id-dokument jiddeskrivi metodu ta' ttestjar, li jippermetti evalwazzjoni tal-effetti ta' ssutanza kimika tat-test fuq l-ispeċi tal-pjanta akwatika bl-għeruq *Myriophyllum spicatum*, li tikber f'sistema tas-sediment tal-ilma. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat parzjalment fuq il-metodi eżistenti (1) (2) (8) u jqis ir-riċerka riċenti relatata mal-valutazzjoni tar-riskju tal-pjanti akwatiċi (3). Il-metodu tas-sediment tal-ilma ġie vvalidat minn ring test internazzjonali li twettaq bl-ispeċijiet *Myriophyllum* li tkabbret f'kundizzjonijiet statiċi, li ġew esposti għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' applikazzjonijiet magħmula permezz tal-kolonna tal-ilma (9). Madankollu, is-sistema tat-test hija faċilment adattata biex tippermetti għal esponiment permezz tas-sediment modifikat jew esponiment permezz tal-fażi tal-ila f'xenarji semistatiċi jew bid-doża pulsata, għalkemm dawn ix-xenarji ma ġewx formalment ittestjati. Barra minn hekk, il-metodu ġenerali jista' jintuża għal speċijiet oħrajn bl-għeruq, mgħaddsa u emerġenti, inkluż speċi oħra tal-*Myriophyllum* (eż *Myriophyllum aquaticum*) u *Glyceria maxima* (10). Modifikazzjonijiet tal-kundizzjonijiet tat-test, tad-disinn u tad-durata jistgħu jkunu meħtieġa għal speċi alternattivi. B'mod partikolari, huwa meħtieġ aktar xogħol biex jiġu definiti l-proċeduri xierqa għall-*Myriophyllum aquaticum*. Dawn l-għażliet mhumiex ippreżentati fid-dettall f'dan il-metodu ta' ttestjar, li jiddeskrivi l-approċċ standard għall-esponiment tal-*Myriophyllum spicatum* f'sistema statika permezz tal-fażi tal-ilma.

3. Il-metodu ta' ttestjar japplika għal sustanzi, li għalihom il-metodu ta' ttestjar ġie vvalidat, (ara d-dettalji fir-rapport tar-ring test (9)) jew għal formulazzjonijiet jew taħlitiet magħrufa. Jista' jitwettaq test *Myriophyllum* biex jissodisfa rekwiżit tad-dejta tal-Livell 1 ikkawżat minn sustanza kimika tat-test potenzjali tal-qsim tas-sediment jew mod ta' azzjoni/kwistjonijiet tas-selettività. Bl-istess mod, jista' jkun meħtieġ test *Myriophyllum* ibbażat fil-laboratorju bħala parti minn strateġija ta' livell ogħla biex jiġi indirizzat tħassib dwar ir-riskju għal pjanti akwatiċi. Ir-raġuni speċifika għat-twettiq ta' test sejra tiddetermina r-rotta tal-esponiment (jiġifieri permezz tal-ilma jew tas-sediment). Qabel l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar ta' taħlita maħsuba għal skop regolatorju, għandu jiġi kkunsidrat jekk, u jekk ikun hekk għaliex, jista' jipprovdi riżultati adegwati għal dak il-għan. Tali kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa, meta hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

▼M7

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

4. It-test huwa mfassal biex jevalwa l-effetti relatati mat-tkabbir veġetattiv tal-pjanti tal-*Myriophyllum* li jikbru fil-midja standardizzata (ilma, sediment u nutrijenti). Għal dan il-għan, apiċi tar-rimjiet ta' pjanti b'saħħithom li ma jifjorixxux huma mħawla f'sediment standardizzat, artifiċjali, li huwa ssupplimentat b'nutrijenti addizzjonali biex jiġi żgurat it-tkabbir tal-pjanti adegwat, u mbagħad jinżamm f'medium Smart u Barko (Appendiċi 1). Wara perjodu ta' stabbilment biex jippermetti għall-formazzjoni tal-għeruq, il-pjanti huma esposti għal serje ta' konċentrazzjonijiet tat-test miżjuda mal-kolonna tal-ilma. Inkella, l-esponiment permezz tas-sediment jista' jiġi simulat billi jiġi modifikat is-sediment artifiċjali bis-sustanza kimika tat-test u jiġu trapjantati l-pjanti f'dan is-sediment modifikat. Fiż-żewġ każijiet, il-pjanti huma sussegwentement miżmuma taħt kundizzjonijiet ambjentali kontrollati għal 14-il ġurnata. Effetti fuq it-tkabbir huma determinati minn valutazzjonijiet kwantitattivi tat-tul tar-rimja, tal-piż frisk u tal-piż niexef, kif ukoll osservazzjonijiet kwalitattivi ta' sintomi bħall-klorożi, nekrożi jew sfigurazzjoni tat-tkabbir.

5. Biex jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi, it-tkabbir fis-soluzzjonijiet tat-test huwa mqabbel mat-tkabbir tal-pjanti tal-kontroll, u l-konċentrazzjoni li tikkawża inibizzjoni speċifikata x % tat-tkabbir li hija determinata u espressa bħala EC_x; "x" tista' tkun kwalunkwe valur skont ir-rekwiżiti regolatorji, eż. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Għandu jiġi nnotat li l-istimi tal-valuri EC_{10} u EC_{20} huma biss affidabbli u xierqa f'testijiet fejn il-koeffiċjenti tal-varjazzjoni fil-pjanti tal-kontroll jaqgħu taħt il-livell tal-effett li qed ikun stmat, jiġifieri l-koeffiċjenti tal-varjazzjoni għandhom ikunu <20 % għal stima robusta ta' EC_{20}.

6. Kemm ir-rata tat-tkabbir medja speċifika (stmata minn evalwazzjonijiet tat-tul tar-rimja, piż tar-rimja friska u piż tar-rimja niexfa) u r-rendiment (stmat miż-żieda fit-tul tar-rimja, piż tar-rimja friska u piż tar-rimja niexfa) ta' pjanti mhux trattati u trattati għandhom jiġu determinati. Ir-rata speċifika tat-tkabbir (r) u r-rendiment (y) huma sussegwentement użati biex jiġu determinati E_rC_x (e.g. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) u E_yC_x (e.g. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}), rispettivament.

7. Jekk meħtieġ, il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bl-ebda effett osservat (NOEC) jistgħu jiġu determinati statistikament minn stimi tar-rati tat-tkabbir speċifiċi u mir-rendiment.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

8. Metodu analitiku, b'sensittività xierqa għall-kwantifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi fil-mezz tat-test, għandu jkun disponibbli.

9. Informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test li tista' tkun utli biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula strutturali, il-kompożizzjoni u fil-każ ta' sustanzi multi kostitwenti, UVCBs, taħlitiet u formulazzjonijiet, il-purità, is-solubbiltà tal-ilma, l-istabilità fl-ilma u fid-dawl, il-kostant tad-dissoċjazzjoni tal-aċidu (pK_a), il-koeffiċjent tal-partizzjoni oktanol-ilma (K_{ow}), jekk disponibbli K_d għas-sedimenti, il-pressjoni tal-fwar u l-bijodegrabbiltà. Is-solubilità tal-ilma u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jikkalkulaw il-kostant tal-Liġi ta' Henry, li se jindika jekk huwiex probabbli li jkun hemm telf sinifikanti tas-sustanza kimika tat-test waqt il-perjodu tat-test. Jekk it-telf tas-sustanzi kimiċi tat-test huwa probabbli, it-telf għandu jkun ikkwantifikat u għandhom jiġu dokumentati l-passi sussegwenti biex jiġi kontrollat tali telf. Meta l-informazzjoni dwar is-solubbiltà u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx waħda ċerta, huwa rrakkomandat li dawn il-karatteristiċi jiġu vvalutati skont il-kundizzjonijiet tat-test, jiġifieri medium tat-tkabbir, temperatura, reġim tad-dawl li għandhom jintużaw fit-test. *Nota*: meta erbiċidi perossidanti li jiddependu fuq id-dawl jiġu ttestjati, id-dawl tal-laboratorju għandu jkun fih il-preżenza ekwivalenti tad-dawl ultravjola tax-xemx li jinsab fid-dawl tax-xemx naturali.

▼M7

10. Il-pH għandu jitkejjel u jiġi aġġustat fil-medium tat-test bħala xieraq. Il-kontroll tal-pH tal-medium tat-test huwa partikolarment importanti, eż. meta jiġu ttestjati metalli jew sustanzi kimiċi li huma instabbli idrolitikament. Aktar gwida għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi b'karatteristiċi kimiċi fiżiċi li jagħmluha diffiċli biex isir it-test hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD (11).

VALIDITÀ TAT-TEST

11. Biex ikunu validi r-riżultati tat-test, it-tul tar-rimja totali medju u l-piż frisk tar-rimja totali medju fil-pjanti tal-kontroll għandhom mill-inqas jirdoppjaw waqt il-fażi tal-esponiment tat-test. Barra minn hekk, il-pjanti tal-kontroll m'għandhomx juru xi sintomu viżiv ta' kloroži u għandhom ikunu viżwalment ħielsa mill-kontaminazzjoni minn organiżmi oħra bħall-algi u/jew films batterjali fuq il-pjanti, fuq il-wiċċ tas-sediment u fil-medium tat-test.

12. Il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni għar-rendiment ibbażat fuq il-kejl tal-piż frisk tar-rimja (jiġifieri mill-bidu tat-test sat-tmiem tat-test) fil-kulturi tal-kontroll ma jaqbiżx il-35 % bejn ir-repliki.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

13. Sustanza(i) ta' referenza, bħal 3,5-diklorofenol użat fir-ring test (9), għandhom jiġu ttestjati perjodikament sabiex tiġi ċċekkjata l-prestazzjoni tal-proċedura tat-test matul iż-żmien. Id-dejta tar-ring test tindika li l-valuri medji EC_{50} ta' 3,5-DCP għall-varjabbli tar-rispons differenti kienu bejn 4.7 u 6.1 mg/l (ara r-rapport tar-ring test għal dettalji tal-intervall tal-kunfidenza antiċipat madwar dawn il-valuri). Huwa rakkomandabbli li tittestja sustanza kimika tar-referenza mill-inqas darbtejn f'sena jew, fejn l-ittestjar ma jitwettaqx b'mod frekwenti, b'mod parallel mat-testijiet tat-tossiċità definittivi. Gwida għall-valuri EC_{50} mistennija għal 3,5-DCP hija pprovduta fir-Rapport Statistiku tar-Ring test Internazzjonali (9).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

L-apparat tat-test

14. It-test għandu jitwettaq taħt kundizzjonijiet ambjentali kontrollati, jiġifieri f'kompartiment tat-tkabbir, kamra tat-tkabbir jew laboratorju, b'tul tal-jum, dawl u temperatura kontrollabbli (ara t-taqsima "Kundizzjonijiet tat-test" paragrafi 56-58). Il-kulturi tal-ħażna għandhom jinżammu separatament mir-reċipjenti tat-test.

15. L-istudju għandu jitwettaq bl-użu ta' reċipjenti tat-test tal-ħġieġ bħal akwarji jew beakers; beakers tal-ħġieġ taż-2-l (ta' madwar 24 cm għoli u 11 cm dijametru) jintużaw ta' spiss. Madankollu, reċipjenti oħrajn (jiġifieri ikbar) jistgħu jkunu adattati sakemm ikun hemm biżżejjed fond tal-ilma biex jippermetti tkabbir mingħajr limitu u jżomm il-pjanti mgħarrqa tul id-durata tat-test.

16. Qsari tal-pjanti tal-plastik jew tal-ħġieġ (madwar 9 cm dijametru u 8 cm għoljin u 500 ml volum) jistgħu jintużaw bħala kontenituri biex iżommu l-pjanti fis-sediment. Inkella, jistgħu jintużaw beakers tal-ħġieġ u huma ppreferuti f'ċertu każijiet (eż. l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi idrofobiċi jew sustanzi kimiċi b'K_{ow} għoli).

17. L-għażla tad-daqs tal-qasrija/beaker għandha tiġi kkunsidrata flimkien mal-għażla tar-reċipjenti tat-test u d-disinn tat-test ippreferut (ara hawn taħt). Jekk jintuża d-Disinn tat-Test A (rimja waħda għal kull qasrija bi tliet qsari f'kull reċipjent) b'hekk jistgħu jkunu meħtieġa qsari iżgħar jew reċipjenti ikbar. Jekk jintuża d-Disinn tat-Test B (tliet rimjiet għal kull qasrija u qasrija waħda għal kull reċipjent) b'hekk id-daqsijiet tal-qasrija u tar-reċipjent iddikjarati għandhom ikunu adegwati. Fil-każijiet kollha, il-fond minimu tal-ilma għandu jkun 12 cm 'il fuq mill-quċċata tas-sediment u l-proporzjon tal-erja tas-superfiċje/volum tal-wiċċ tas-sediment għall-erja tas-superfiċje/volum tal-ilma għandu jiġi rreġistrat.

▼M7

Organiżmu tat-test

18. L-approċċi ġenerali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar jistgħu jintużaw biex jittestjaw firxa ta' speċi tal-pjanti akwatiċi. Madankollu, il-kundizzjonijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar ġew imfassla għall-ittestjar tal-ispeċi tal-ħaxixa tal-morliti tal-ilma, *Myriophyllum spicatum*. Din l-ispeċi tappartjeni għall-familja dikotiledoni, Haloragaceae.

19. *Myriophyllum spicatum* (ħaxixa tal-morliti tal-Ewrasja) hija speċi bl-għeruq li tittollera firxa wiesgħa ta' kundizzjonijiet u tinsab f'korpi tal-ilma kemm statiċi kif ukoll mexxejja. *M. spicatum* hija perenni li tmut lura għall-għeruq tagħha matul ix-xitwa. Il-pjanti normalment jiffjorixxu u jitfgħu iż-żerriegħa liberament għalkemm il-propogazzjoni minn frammenti tal-blanzuni awżiljarji jew taz-zokk li jinqatgħu b'mod naturali jew wara disturb, hija ta' spiss il-metodu primarju tal-kolonizzazzjoni.

Kultivazzjoni tal-organiżmu tat-test

20. Il-pjanti jistgħu jinkisbu minn popolazzjonijiet naturali jew minn fornituri tal-pjanti akwatiċi. Fiż-żewġ każijiet, is-sors tal-pjanti għandu jiġi dokumentat u l-identità tal-ispeċi għandha tiġi verifikata. Għandha tingħata attenzjoni kbira biex jiġi żgurat li l-ispeċi korretta tinkiseb meta tinġabar il-*Myriophyllum spicatum* mill-post, speċjalment f'reġjuni fejn tista' tibridizza ma' speċi oħra *Myriophyllum*. Jekk ikun hemm xi dubju, l-użu ta' kulturi tal-laboratorju verifikati minn sorsi magħrufa huwa rakkomandat. Pjanti li ġew esposti għal kwalunkwe kontaminanti kimiċi, jew miġbura minn siti li huma magħrufa li huma kontaminati, m'għandhomx jintużaw f'dan it-test.

21. F'reġjuni fejn *M. spicatum* mhix disponibbli matul ix-xhur tax-xitwa, jista' jkun meħtieġ il-manteniment fit-tul tal-kulturi tal-ħażna taħt kundizzjonijiet ta' serra jew laboratorju. Kulturi tal-ħażna għandhom jinżammu taħt kundizzjonijiet simili għall-kundizzjonijiet tat-test għalkemm jistgħu jitnaqqsu l-irradjanza u t-temperatura sabiex titnaqqas il-frekwenza tal-manutenzjoni tal-kultura (eż. meta testijiet tal-*Myriophyllum* mhumiex ippjanati għal perjodu). Użu ta' akkwarji u qsari tal-pjanti ikbar minn dawk li jintużaw fit-test, huwa rrakkomandat sabiex jippermetti l-ispazju għall-proliferazzjoni. Il-kompożizzjoni tas-sediment u tal-midja tal-ilma għandha tkun l-istess bħal dik użata għat-testijiet għalkemm metodi alternattivi tal-fertilizzazzjoni tat-test jistgħu jiġu adottati (eż. l-użu ta' formulazzjonijiet tal-fertilizzant kummerċjali ta' rilaxx bil-mod)

22. Pjanti tal-ħażna għandhom ikunu viżibilment ħielsa mill-kontaminazzjoni ma' kwalunkwe organiżmi oħra, inkluż bebbux, alka filamentuża, fungi u insetti, eż. bajd jew larva tal-kamla *Paraponyx stratiotata* u larva jew adulti tal-curculionidae *Eubrychius velutus*. Jista' jkun meħtieġ it-tlaħliħ tal-materjal tal-pjanti fl-ilma frisk biex tiġi eliminata kontaminazzjoni viżibbli. Barra minn hekk, għandhom isiru sforzi biex jitnaqqas l-iżvilupp tal-alka uniċellulari u l-kontaminazzjoni batterjoloġija għalkemm l-isterilità kompleta tal-materjal tal-pjanti mhix neċessarja. Kulturi tal-ħażna għandhom jiġu sorveljati u trapjantati kif meħtieġ biex jiġi evitat l-iżvilupp tal-kontaminazzjoni tal-alka u tal-batterji. L-arjazzjoni tal-kulturi tal-ħażna tista' tkun ta' benefiċċju jekk il-kontaminazzjoni tal-alga jew tal-batterji ssir problematika.

23. Fil-każijiet kollha, il-planti huma kkulturati/akklimatizzati taħt kundizzjonijiet li huma simili, iżda mhux neċessarjament identiċi, għal dawk użati fit-test għal perjodu adegwat (jiġifieri > ġimagħtejn) qabel l-użu tagħhom f'test.

24. Kulturi tal-ħażna li jifjorixxu m'għandhomx jintużaw f'test minħabba li r-rati tat-tkabbir ġeneralment jonqsu matul u wara li jifjorixxu.

▼M7

Sediment

25. Is-sediment ifformulat li ġej, ibbażat fuq is-sediment artifiċjali użat fil-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness (8), huwa rrakkomandat għall-użu f'dan it-test. Is-sediment huwa ppreparat kif deskritt f'TM C.28, minbarra ż-żieda tan-nutrijenti kif deskritt hawn taħt:

a) 4-5 % pit (piż niexef, skont 2 ± 0.5 % karbonju organiku) viċin kemm jista' jkun għal pH 5.5 sa 6.0; huwa importanti li jintuża l-pit f'forma ta' trab, mitħun fin (preferibbilment bid-daqs tal-partikola ta' < 1 mm) u jkun imnixxef bl-arja biss.

b) 20 % tafal tal-kawlina (piż fin-niexef) (kontenut ta' kawlina preferibbilment aktar minn 30 %).

c) 75-76 % ramel tal-quartz (piż fin-niexef) (għandu jippredomina ramel fin b'aktar minn 50 % tal-partiċelli bejn 50 u 200 μm).

d) Medium tan-nutrijent akweju huwa miżjud b'tali mod li l-aħħar lott tas-sediment ikun fih 200 mg/Kg sediment niexef kemm tal-klorur tal-ammonju kif ukoll tal-fosfat tas-sodju u l-kontenut tal-umdità tal-aħħar taħlita huwa fil-firxa ta' 30-50 %.

e) Jiżdied karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura ($CaCO_3$) sabiex jiġi aġġustat il-pH tat-taħlita finali tan-naqal għal 7.0 ± 0.5.

26. Is-sors tal-pit, it-tafal tal-kawlina u r-ramel għandu jkun magħruf u jkun dokumentat. Jekk l-oriġini ma tkunx magħrufa jew toħloq xi livell tat-tħassib, allura l-komponenti rispettivi għandhom jiġu ċċekjati għall-assenza tal-kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti organoklorurati, komposti organofosforiċi).

27. Il-kostitwenti niexfa tas-sediment għandhom jitħalltu b'mod omoġenju qabel titħallat is-soluzzjoni tan-nutrijent akweju kompletament fis-sediment. Is-sediment imxarrab għandu jkun ippreparat mill-inqas jumejn qabel l-użu biex jippermetti t-tixrib komplet tal-pit u biex jipprevjeni milli l-frak idrofobiċi tal-pit imorru f'wiċċ l-ilma meta s-sediment jinkesa bil-midja; qabel l-użu, is-sediment niedi jista' jinħażen fid-dlam.

28. Għat-test, is-sediment huwa trasferit f'kontenituri ta' daqs xieraq, bħal qsari tal-pjanti ta' dijametru li joqgħod fir-reċipjenti tal-ħġieġ (il-erja tas-superfiċje tas-sediment għandha tkopri madwar 70 % jew aktar tal-erja tas-superfiċje tar-reċipjent). F'każijiet fejn il-kontenitur għandu t-toqob fil-qiegħ, biċċa karta filtru fil-qiegħ tal-kontenitur tgħin biex iżżomm is-sediment fil-kontenitur. Il-qsari jimtlew bis-sediment b'tali mod li l-wiċċ tas-sediment huwa livell, qabel jitgħatta b'saff irqiq (~ 2-3 mm) ta' materjal inerti bħal ramel, żrar ortikulturali fin (jew qroll imfarrak) biex iżomm is-sediment f'postu.

Medium tat-test

29. Il-medium Smart u Barko (12) huwa rakkomandat għall-ikkulturar u l-ittestjar *Myriophyllum spicatum*. Il-preparazzjoni ta' dan il-medium hija deskritta fl-Appendiċi 1. Il-pH tal-medium (faži tal-ilma) fil-bidu tat-test għandu jkun bejn 7.5 u 8.0 għat-tkabbir ottimali tal-pjanti.

Disinn sperimentali

30. It-test għandu jinkorpora minimu ta' sitt reċipjenti tat-test replikati għall-kontroll mhux trattat u minimu ta' erba' reċipjenti tat-test replikati għal kull wieħed minn minimu ta' ħames livelli tal-konċentrazzjoni.

31. Jekk ma tkunx meħtieġa determinazzjoni tal-NOEC, id-disinn tal-ittestjar jista' jiġi mmodifikat biex jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni.

▼M7

32. Kull reċipjent tat-test jirrappreżenta replika li fiha tliet rimjiet. Hemm żewġ għażliet għat-tkabbir ta' tliet rimjiet f'kull reċipjent tat-test:

— Disinn tat-Test A: rimja waħda għal kull qasrija u tliet qsari għal kull reċipjent.

— Disinn tat-Test B: tliet rimjiet għal kull qasrija u qasrija waħda għal kull reċipjent.

— Disinni tat-test alternattivi ta' rimja waħda għal kull qasrija għal kull reċipjent tat-test huma aċċettabbli sakemm ir-replikazzjoni hija aġġustata kif meħtieġ biex jinkisbu l-kriterji tal-validità meħtieġa.

33. Ir-reċipjenti tat-test individwali għandhom jiġu assenjati bl-addoċċ lill-gruppi tat-trattament. Disinn bl-addoċċ għall-post tar-reċipjenti tat-test fiż-żona tat-test huwa meħtieġ biex titnaqqas l-influwenza ta' differenzi tal-ispazju fl-intensità tad-dawl jew fit-temperatura.

Konċentrazzjonijiet u gruppi ta' kontroll tas-sustanza kimika tat-test

34. Il-konċentrazzjonijiet għandhom normalment isegwu serje ġeometrika; il-fattur tas-separazzjoni bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test m'għandux jeċċedi it-3.2. Għarfien minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test minn test li jsib il-medda se jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa.

35. Għad-determinazzjoni ta' EC_x, il-konċentrazzjonijiet tat-test iridu jsostnu l-valur EC_x sabiex jiġi żgurat livell ta' kunfidenza adegwat. Pereżempju, jekk tkun qed tikkalkula EC_{50}, l-iktar konċentrazzjoni għolja għandha tkun ikbar mill-valur tal-EC_{50}. Jekk il-valur EC_{50} jinstab barra l-firxa ta' konċentrazzjonijiet tat-test, intervalli ta' kunfidenza assoċjati jkunu kbar u valutazzjoni xierqa tal-fit statistiku tal-mudell tista' ma tkunx possibbli. L-użu ta' aktar konċentrazzjonijiet tat-test se jtejjeb l-intervall tal-valr EC_x li jirriżulta.

36. Sabiex tiddetermina l-LOEC/NOEC (punt tat-tmiem mhux obbligatorju), l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed li t-tkabbir ma jkunx sinifikament differenti mit-tkabbir fil-pjanti tal-kontroll. Barra minn hekk, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed li t-tkabbir ikun ferm iktar baxx minn dik ta' fil-kontroll. L-użu ta' aktar repliki se jsaħħaħ il-poter statistiku tal-konċentrazzjoni bla effett/disinn ANOVA.

Test tal-limitu

37. F'każijiet fejn test li jsib il-medda jindika li s-sustanza kimika tat-test m'għandha l-ebda effett negattiv f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu tas-solubbiltà tagħha fil-medium tat-test jew fil-każ ta' formulazzjoni sal-limitu tad-dispersibbiltà, jista' jittieħed test tal-limitu biex jiffaċilita paragun tar-risposti fi grupp tal-kontroll u fi grupp tat-trattament wieħed — 100 mg/l jew konċentrazzjoni ugwali għal-limitu tas-solubbiltà — jew 1 000 mg/kg sediment niexef. Dan it-test għandu jsegwi l-prinċipji ġenerali ta' test tad-doża-rispons standard, bl-eċċezzjoni li żieda fin-numru minimu tar-repliċi għal sitt reċipjenti tat-test għal kull kontroll u konċentrazzjoni hija rakkomandata. It-tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-media, eż. Test-t ta' Student.

Is-soluzzjonijiet tat-test

38. Soluzzjonijiet tat-test huma normalment ippreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni tal-ħażna, ippreparata billi tħoll jew ixxerred is-sustanza kimika tat-test fil-medium Smart u Barko, bl-użu ta' ilma demineralizzat (jiġifieri distillat jew dejonizzat) (ara l-Appendiċi 1).

▼M7

39. L-ogħla konċentrazzjoni tat-test normalment m'għandhiex teċċedi s-solubbiltà tal-ilma tas-sustanza kimika tat-test jew, fil-każ ta' formulazzjonijiet, id-dispersibbiltà taħt il-kundizzjonijiet tat-test.

40. Għal sustanzi kimiċi ta' solubbiltà tal-ilma baxxa jista' jkun meħtieġ li tiġi ppreparata soluzzjoni tal-ħażna konċentrata jew dispersjoni tas-sustanza kimika bl-użu ta' solvent organiku jew dispersant sabiex jiffaċilita ż-żieda ta' kwantitajiet preċiżi tas-sustanza kimika tat-test għall-medium tat-test u jgħin fid-dispersjoni u x-xoljiment tiegħu. Għandu jsir kull sforz biex jiġi evitat l-użu ta' tali solventi jew dispersanti. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossiċità li tirriżulta mill-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi awżiljarji. Pereżempju, solventi li jintużaw b'mod komuni li ma jikkawżawx fitotossiċità fil-konċentrazzjonijiet sa 100 µl//l jinkludu aċeton u dimetilformamid. Jekk jintuża solvent jew dispersant, il-konċentrazzjoni finali tiegħu għandha tiġi rappurtata u miżmuma fil-minimu (≤100 µl/l). Taħt dawn iċ-ċirkostanzi, it-trattamenti u l-kontrolli (tas-solvent) kollha għandu jkun fihom l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew dispersant. Repliki tal-kontroll mhux trattati li ma fihomx solvent jew dispersant huma wkoll inkorporati fid-disinn tat-test. Tingħata gwida ulterjuri dwar l-użu ta' aġenti dispersivi f'Dokument ta' Gwida OECD (11).

PROĊEDURA TAT-TEST

41. Il-proċedura tat-test tvarja skont ir-rotta tal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (jiġifieri permezz tal-faża tal-ilma jew tas-sediment). L-imġiba probabbli tas-sustanza kimika tat-test f'sistema tal-ilma-sediment għandha tiġi kkunsidrata biex tinforma l-għażla tar-reġim tal-esponiment użat fit-test (jiġifieri tiġdid statiku jew mhux statiku, ilma modifikat jew sediment modifikat). Testijiet tas-sediment modifikat jistgħu jiġu ppreferuti f'ċertu każijiet għal sustanzi kimiċi li huma mbassra li jisseparaw is-sediment b'mod sinifikanti.

Faża tal-istabbilment

42. Apiċi/ponot tar-rimja b'saħħithom, jiġifieri mingħajr rimjiet fil-ġenb, jinqatgħu mill-pjanti tal-kultura biex jagħtu tul tar-rimja ta' 6 cm (± 1 cm). Għad-Disinn tat-Test A (rimja waħda għal kull qasrija u tliet qsari għal kull reċipjent) ponot tar-rimja singoli huma mħawla f'kull qasrija. Għad-Disinn tat-Test B (tliet rimjiet għal kull qasrija u qasrija waħda għal kull reċipjent) erba' sa ħames apiċi huma mħawla f'kull qasrija li fiha s-sediment.

43. Fiż-żewġ każijiet, il-qsari żejda għandhom jiġu mħawla biex jippermettu għall-għażla ta' pjanti uniformi fil-bidu tat-test, kif ukoll biex jipprovdu pjanti żejda biex jintużaw għall-ispezzjoni tat-tkabbir tal-għeruq immedjatament qael it-trattament u pjanti żejda biex jinħasdu għall-bijomassa tar-rimja u l-kejl tat-tul fil-Jum 0.

44. Rimjiet huma mdaħħla b'tali mod li madwar tliet cm, li jkopru mill-inqas żewġ nodi, huma taħt il-wiċċ tas-sediment.

45. Il-qsari huma mbagħad trasferiti fir-reċipjenti tat-test taħt l-istess kundizzjonijiet ambjentali għall-faża tal-esponiment u miżmuma għal sebat ijiem f'medium Smart u Barko biex jiġi kkawżat l-iżvilupp tal-għeruq.

46. Wara dan iż-żmien, bosta pjanti fi qsari żejda għandhom jitneħħew għall-ispezzjoni tat-tkabbir tal-għeruq. Jekk it-tkabbir tal-għeruq mhux viżibbli (jiġifieri l-punti tal-għeruq mhumiex viżibbli), allura l-faża tal-istabbilment għandha tiġi estiża sakemm it-tkabbir tal-għeruq ikun viżibbli. Dan il-pass huwa rrakkomandat biex jiżgura li l-pjanti qed jikbru b'mod attiv fil-ħin tal-bidu tat-test.

▼M7

Għażla ta' materjal tal-pjanti uniformi.

47. Għad-Disinn tat-Test A (rimja waħda għal kull qasrija u tliet qsari għal kull reċipjent) il-qsari huma magħżulin għall-uniformità qabel il-bidu tat-test. Għad-Disinn tat-Test B (tliet rimjiet għal kull qasrija u qasrija waħda għal kull reċipjent), pjanti żejda huma mneħħija biex iħallu tliet pjanti li huma uniformi fid-daqs u fid-dehra.

Esponiment permezz tal-fażi tal-ilma

48. Qsari, magħżula għall-uniformità, huma mpoġġija fir-reċipjenti tat-test kif meħtieġ għad-disinn sperimentali. Il-medium Smart u Barko huwa mbagħad miżjud mar-reċipjenti tat-test. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat it-taħwid fis-sediment. Għal dan il-għan, jista' jiżdied mezz bl-użu ta' lembut jew diska tal-plastik biex jgħatti s-sediment waqt li l-medium jitferra' fir-reċipjenti tat-test sakemm id-diska titneħħa immedjatament wara. Inkella, il-qsari tal-pjanti jistgħu jitqiegħdu fir-reċipjenti tat-test wara ż-żieda tal-midja. Fiż-żewġ każijiet, midja friska tista' tintuża fil-bidu tal-fażi tal-esponiment, jekk meħtieġ biex timminimizza l-akkumulazzjoni potenzjali tal-alka u tal-batterji jew biex tippermetti l-preparazzjoni ta' lottijiet singoli tas-soluzzjoni tat-test madwar repliki.

49. It-tul tar-rimja 'l fuq mis-sediment titkejjel, jew qabel jew wara ż-żieda tal-medium.

50. L-ammonti rilevanti tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jiġu miżjuda mal-medium tat-test qabel jiżdied mar-reċipjenti tat-test. Inkella, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi introdotta mal-medium wara li tiżdied mar-reċipjenti tat-test. F'dan il-każ, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test tkun imqassma b'mod omoġenju fis-sistema tat-test mingħajr ma tiddisturba s-sediment.

51. Fil-każijiet kollha, id-dehra (eż. ċara, imdardra, eċċ) tal-medium tat-test hija rreġistrata fil-bidu tat-test.

Esponiment permezz tas-sediment

52. Sedimenti modifikati tal-konċentrazzjoni magħżula huma ppreparati biż-żieda ta' soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test direttament mas-sediment frisk. Soluzzjoni tal-ħażna tas-sustanza kimika tat-test dissolta f'ilma dejonizzat titħallat mas-sediment ifformulat b'mitħna tal-irrumblar, ħallat tal-għalf jew tħallit bl-idejn. Jekk ftit li xejn tinħall fl-ilma, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi dissolta f'volum żgħir kemm jista' jkun ta' solvent organiku xieraq (eż.. essan, aċeton jew kloroformi). Din is-soluzzjoni hija mbagħad imħallta ma' madwar 10 g ta' ramel tal-kwarz għal reċipjent tat-test wieħed. Is-solvent jitħalla jevapora u r-ramel huwa mbagħad imħallat mal-ammont xieraq tas-sediment għal kull beaker tat-test. Aġenti li huma volatili faċilment jistgħu jintużaw biex iħollu, jferrxu jew jemulsifikaw is-sustanza kimika tat-test. Għandu jiġi mfakkar li l-volum/piż tar-ramel modifikat bis-sustanza kimika tat-test għandu jiġi kkunsidrat fit-tħejjija finali tas-sediment (jiġifieri s-sediment għandu għalhekk ikun ippreparat b'inqas ramel). Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test miżjuda mas-sediment tiġi distribwita sew u b'mod uniformi fis-sediment.

53. Is-sediment modifikat jimtela fil-qsari (kif deskritt hawn fuq). Il-pjanti, magħżula għall-uniformità u għal sistema tal-għeruq adegwata, jitneħħew mill-qsari użati waqt il-fażi tal-istabbilment u jiġu trapjantati fis-sediment modifikat kif deskritt hawn fuq.

54. Il-qsari jitpoġġew fir-reċipjenti tat-test kif meħtieġ għad-disinn sperimentali. Il-medium Smart u Barko huwa mbagħad miżjud b'attenzjoni (jiġifieri bl-użu ta' lembut) sabiex jiġi evitat it-taħlit fis-sediment. It-tul tar-rimja 'l fuq mis-sediment titkejjel, jew qabel jew wara ż-żieda tal-midja.

▼M7

Manutenzjoni tal-livelli tal-ilma waqt id-durata tat-test

55. Il-volum tal-ilma finali għandu jiġi reġistrat u l-livell tal-ilma jiġi mmarkat fuq kull reċipjent tat-test. Jekk l-ilma jevapora waqt it-test b'aktar minn 10 %, il-livell tal-ilma għandu jiġi aġġustat bl-ilma distillat. Jekk ikun meħtieġ, il-beakers jistgħu jitgħattew b'mod laxk b'għatu trasparenti bħal għotjien tal-plastik trasparenti biex tiġi minimizzata l-evaporazzjoni u l-kontaminazzjoni ma' spori tal-alka.

Kundizzjonijiet tat-test

56. Dawl fluworexxenti baxx u/jew qawwi jintuża biex jipprovdi l-irradjanza tad-dawl fil-medda ta' madwar 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ meta mkejjel bħala radjazzjoni attiva fotosintetika (400-700 nm) fil-wiċċ tal-ilma u bl-użu ta' proporzjon ċar:skur ta' 16:8 h. Kwalunkwe differenza mill-irradjanza tad-dawl magħżula fl-erja tat-test m'għandhiex teċċedi l-medda ta' ± 15 %.

57. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test hija ta' 20 ± 2°C.

58. Il-pH tal-medium ta' kontroll ma għandux jiżdied b'aktar minn 1.5 unitajiet matul it-test. Madankollu, devjazzjoni ta' aktar minn 1.5 unità ma tagħmilx it-test invalidu meta jkun jista' jintwera li l-kriterji tal-validità speċifikati qabel jiġu sodisfatti.

Durata tat-test

59. Il-perjodu ta' esponiment huwa ta' 14-il ġurnata.

Kejliet u determinazzjonijiet analitiċi

60. Wara l-faża tal-istabbilment u immedjatament qabel it-trattament (jiġifieri fil-Ġurnata 0), pjanti żejda minn ħames qsari magħżula każwalment għat-tliet pjanti għal kull disinn tal-qasrija jew 15-il qasrija għal pjanta waħda għal kull disinn tal-qasrija, huma maħsuda għall-evalwazzjoni tat-tul tar-rimja u l-piż frisk u niexef kif deskritt hawn taħt.

61. Għal pjanti trasferiti fil-faża tal-esponiment, isiru l-evalwazzjonijiet li ġejjin kif muri fit-Tabella 1:

— Evalwazzjonijiet tat-tul tar-rimja prinċipali, numru tar-rimja tal-ġenb u tul tar-rimja tal-ġenb huma rreġistrati għall-inqas fl-aħħar tal-perjodu tal-esponiment (eż. fil-ġurnata 14).

— Evalwazzjonijiet viżwali tas-saħħa tal-pjanti huma rreġistrati mill-inqas tliet darbiet waqt il-perjodu tal-esponiment (eż. fil-ġranet 0, 7 u 14).

— Evalwazzjonijiet tal-piż frisk u l-piż xott tar-rimja huma magħmulin fl-aħħar tat-test (jiġifieri fil-Ġurnata 14).

62. It-tul tar-rimja huwa determinat bl-użu ta' riga. Jekk rimjiet tal-ġenb huma preżenti, in-numru u t-tulijiet tagħhom għandhom jitkejlu wkoll.

63. Evalwazzjonijiet viżwali tas-saħħa tal-pjanti jsiru billi tiġi rreġistrata d-dehra tal-pjanti u l-kundizzjoni ġenerali tal-medium tat-test. Osservazzjonijiet li għandhom jiġu nnotati jinkludu:

— In-nekrożi, il-klorożi jew kwalunkwe telf tal-kulur bħal ħmurija eċċessiva relattiva għall-pjanti tal-kontroll.

— L-iżvilupp tal-kontaminazzjoni batterjali jew tal-alka;

— Anormalitajiet tat-tkabbir bħal nuqqas fit-tkabbir, tul internodali mibdul, rimjiet/weraq mgħawwġin, il-proliferazzjoni ta' rimjiet tal-ġenb, telf tal-weraq, telf tal-pressjoni u frammentazzjoni taz-zokk.

▼M7

— Evalwazzjonijiet viżwali tas-saħħa tal-għeruq isiru fit-tmiem tat-test, billi jinħasel is-sediment b'attenzjoni mill-għeruq biex jippermettu l-osservazzjoni tas-sistema tal-għeruq. Skala għall-evalwazzjoni proposta, relattiva għall-pjanti tal-kontroll, tidher hawn taħt:

1) għeruq assenti

2) ftit għeruq

3) żvilupp moderat tal-għeruq

4) żvilupp tal-għeruq tajjeb ħafna, simili għall-kontrolli

64. Evalwazzjonijiet tal-piż frisk isiru fil-bidu u fl-aħħar tat-test billi taqta' r-rimja fil-livell tas-sediment u tixxotta qabel l-użin. Għandha tingħata attenzjoni biex jitneħħew partikoli tas-sediment li jistgħu jaderixxu għall-bażi tar-rimja. Il-materjal tar-rimja mbagħad jitpoġġa f'forn tat-tnixxif f'madwar 60 °C u jiġi mnixxef għal piż kostanti, qabel jerġa' jintiżen u jiġi rreġistrat il-piż niexef.

65. Sommarju tal-evalwazzjonijiet bijoloġiċi minimi meħtieġa tul id-durata tat-test huwa pprovdut fit-Tabella 1.

Tabella 1

Skeda tal-evalwazzjoni

Trattament ta' ġurnata wara (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Tul tar-rimja, tul tar-rimja tal-ġenb u numru	Evalwazzjoni viżwali tar-rimjiet	Piż frisk u niexef tar-rimja Evalwazzjoni viżwali tal-għeruq	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: jindika li evalwazzjonijiet huma meħtieġa f'dawn l-okkażjonijiet
—: jindika li mhux meħtieġ il-kejl

Frekwenza tal-kejl u determinazzjonijiet analitiċi

66. It-temperatura tal-medium fil-kontenitur supplimentari miżmum fl-istess kundizzjonjiet tal-kamra ta' tkabbir, inkubatur jew kamra għandu jiġi rreġistrat mill-inqas darba kuljum (jew kontinwament b'logger tad-dejta).

67. Il-konċentrazzjoni tal-pH u tal-ossiġenu tal-medium tat-test għandha tiġi ċċekkjata fil-bidu tat-test, mill-inqas darba waqt l-istudju u fl-aħħar tal-istudju fir-reċipjenti replikati kollha. F'kull okkażjoni, il-kejliet għandhom jittieħdu fl-istess ħin tal-ġurnata. Jekk jintużaw soluzzjonijiet tal-massa biex jippreparaw ir-repliki kollha f'kull konċentrazzjoni tat-test, allura kejl wieħed ta' kull soluzzjoni tal-massa huwa aċċettabbli fil-Ġurnata 0.

68. L-irradjanza għandha titkejjel fil-kamra tat-tkabbir, inkubatur jew kamra f'punti ekwivalenti għal-livell tal-wiċċ tal-ilma. Il-kejliet għandhom isiru mill-inqas darba fil-bidu tat-test jew waqt it-test. Il-metodu ta' detezzjoni u kejl, b'mod partikolari t-tip ta' senser, jaffettwa l-valur imkejjel. Is-sensers

▼M7

sferiċi (li jirrispondu għad-dawl minn angoli 'l fuq u taħt il-pjan ta' kejl) u s-sensers "cosine" (li jirrispondu għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl) huma ppreferuti minn sensers unidirezzjonali, u ser jagħtu riżultati tal-qari ogħla, għal sors ta' dawl b'ħafna punti tat-tip deskritt hawnhekk.

Kejliet analitiċi tas-sustanza kimika tat-test

69. L-applikazzjoni korretta tas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi appoġġata mill-kejliet analitiċi tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test.

70. Kampjuni tal-ilma għandhom jinġabru għall-analiżi tas-sustanza kimika tat-test ftit wara l-bidu tat-test (jiġifieri fil-ġurnata tal-applikazzjoni għal sustanzi kimiċi tat-test stabbli jew siegħa wara l-applikazzjoni għal sustanzi kimiċi li mhumiex stabbli) u fit-tmiem tat-test għall-konċentrazzjonijiet tat-test kollha.

71. Il-konċentrazzjonijiet fis-sediment u fl-ilma tal-pori tas-sediment għandhom ikunu determinati fil-bidu tat-test u fit-tmiem tat-test, tal-inqas fl-ogħla konċentrazzjoni tat-test, sakemm is-sustanzi kimiċi tat-test huma magħrufa li jkunu stabbli fl-ilma (> 80 % tan-nominali). Il-kejl fis-sediment u fl-ilma tal-pori jista' ma jkunx meħtieġ jekk il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn l-ilma u s-sediment ġiet determinata b'mod ċar fi studju tal-ilma/sediment taħt kundizzjonijiet kumparabbli (eż. proporzjon tas-sediment ma' ilma, metodu tal-applikazzjoni, tip tas-sediment).

72. It-teħid ta' kampjuni tas-sediment fil-bidu tat-test huwa probabbli li jfixkel is-sistema tat-test. Għalhekk, reċipjenti tat-test trattati addizzjonali jistgħu jkunu meħtieġa biex jiffaċilitaw determinazzjonijiet analitiċi fil-bidu tat-test u fit-tmiem tat-test. Bl-istess mod, fejn evalwazzjonijiet intermedji huma neċessarji, jiġifieri fil-ġurnata 7 u l-analiżijiet jeħtieġu kampjuni kbar tas-sediment li ma jistgħux jitneħħew b'mod faċli mis-sistema tat-test, determinazzjonijiet analitiċi għandhom jitwettqu bl-użu ta' reċipjenti tat-test addizzjonali trattati bl-istess mod bħal dawk użati għall-evalwazzjonijiet bijoloġiċi.

73. Ċentrifugazzjoni, pereżempju, ta' 10 000 g u 4 °C għal 30 minuta hija rakkomandata biex tiżola l-ilma interstizjali. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tintwera li ma tassorbix il-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll. F'ċertu każijiet, jista' ma jkunx possibbli li tanalizza konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori jekk id-daqs tal-kampjun huwa żgħir wisq.

74. F'testijiet semistatiċi (jiġifieri esponiment permezz tal-faża tal-ilma) fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika (sustanzi kimiċi) tat-test mhix mistennija li tibqa' fi ħdan l-20 % tal-konċentrazzjoni nominali tul id-durata tat-test mingħajr it-tiġdid tas-soluzzjonijiet tat-test, soluzzjonijiet tat-test użati u ppreparati friski għandhom jittieħdu kampjuni minnhom għall-analiżijiet tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'kull tiġdid.

75. F'każijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza kimika tat-test mhix fi ħdan l- 20 % tan-nominali iżda fejn tista' tiġi pprovduta evidenza suffiċjenti biex turi li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (jiġifieri fi ħdan il-medda ta' 80-120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitwettqu biss fuq l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test.

76. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom bżonn jitwettqu biss fuq reċipjent replikat f'kull konċentrazzjoni tat-test. Inkella, is-soluzzjonijiet tat-test tar-repliki għal kull konċentrazzjoni jistgħu jinġabru flimkien għall-analiżijiet.

77. Jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ġiet miżmuma fi ħdan l-20 % tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, b'hekk l-analiżi tar-riżultati u d-derivazzjoni sussegwenti tal-punti tat-tmiem tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla.

▼M7

78. F'dawn il-każijiet, konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom ikunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet tal-ilma nominali jew imkejla fil-bidu tat-test.

79. Madankollu, jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni naqset (jiġifieri mhix miżmuma fi ħdan l-20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew imkejla inizjali fil-kompartiment trattat) matul it-test, b'hekk l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja ġeometrika waqt l-esponiment jew mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-kompartiment trattat (11).

EVALWAZZJONI TAD-DEJTA

80. F'każijiet fejn l-użu ta' solvent/aġent ta' dispersjoni huwa meħtieġ, id-dejta minn solvent u minn kontrolli mhux trattati tista' tingħabar flimkien għall-finijiet tal-analiżijiet statistiċi sakemm ir-risponsi tas-solvent u tal-kontrolli mhux trattati ma jkunux ferm differenti.

Varjabbli ta' rispons

81. L-għan tat-test huwa li jiddetermina l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv tal-ispeċi tat-test, bl-użu ta' żewġ varjabbli tar-rispons, rata tat-tkabbir speċifika medja u rendiment, kif ġej:

Rata ta' tkabbir speċifika medja

82. Dan il-varjabbli tar-rispons huwa bbażat fuq bidliet fil-logarittmi tat-tul tar-rimja totali, piż tar-rimja friska totali u piż tar-rimja niexfa totali, matul iż-żmien fil-kontroli u f'kull grupp tat-trattament. Dan il-varjabbli huwa kkalkulat għal kull replika ta' kull grupp tal-kontroll u tat-trattament. It-tul u l-piż medju tat-tliet pjanti għal kull reċipjent tat-test (replikat) u, sussegwentement, ir-rata tat-tkabbir għal kull replikat, għandhom jiġu kkalkulati bl-użu tal-formula li ġejja:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

fejn:

μ_{i-j}: rata ta' tkabbir speċifika medja mill-ħin i sa j

N_i: varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'ħin i

N_j: varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'ħin j

t: perjodu ta' ħin minn i sa j

83. Mir-risposti tar-replikat, valur medju għar-rata tat-tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza għandhom jiġu kkalkulati għal kull grupp tat-trattament u tal-kontroll.

84. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għandha tiġi kkalkolata għall-perjodu ta' ttestjar kollu (il-ħin "i" fil-formola ta' hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-ħin "j" huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir speċifika medja flimkien mal-istimi tal-varjanza.

▼M7

85. Perċentwal ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir (I_r) jista' jiġi kkalkulat fuq kull konċentrazzjoni tat-test (grupp ta' trattament) bil-formula li ġejja:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

fejn:

% Ir: perċentwal ta' inibizzjoni f'rata medja ta' tkabbir speċifiku

μC: valur medju għal μin fil-kontroll

μT: valur medju għal μin fil-grupp tat-trattament

Rendiment

86. Dan il-varjabbli tar-rispons huwa bbażat fuq bidliet fit-tul tar-rimja totali, piż tar-rimja friska totali u piż tar-rimja niexfa totali, matul iż-żmien fil-kontroli u f'kull grupp tat-trattament. Il-perċentwal medju fir-rendiment (% Iy) jista' jiġi kkalkulat għal kull grupp tat-trattament kif ġej:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

fejn:

% I_y: tnaqqis perċentwali fir-rendiment

b_C: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għall-grupp ta' kontroll

b_T: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu fil-grupp ta' trattament

Ipplottjar tal-kurvi konċentrazzjoni-rispons

87. Il-kurvi tal-konċentrazzjoni-rispons li għandhom x'jaqsmu mal-inibizzjoni tal-varjabbli tar-rispons (I_r jew I_y) ikkalkulat kif jidher hawn fuq u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu pplottjati.

Stimi tal-EC_x

88. Stimi tal-EC_x (eż. EC_{50}) għandhom ikunu bbażati kemm fuq ir-rata speċifika tat-tkabbir medja (E_rC_x) kif ukoll ir-rendiment (E_yC_x), li kull wieħed minnhom għandu mbagħad ikun ibbażat fuq il-piż tar-rimja friska totali, il-piż tar-rimja niexfa totali u t-tul tar-rimja totali.

89. Għandu jiġi nnotat li l-valuri EC_x ikkalkulati bl-użu ta' dawn il-varjabbli tar-rispons mhumiex komparabbli u din id-differenza hija rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq ir-rata tat-tkabbir speċifika medja (E_rC_x) fil-maġġoranza tal-każi se jkunu ogħla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) — jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-metodu ta' ttestjar huma osservati — minħabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Din id-differenza m'għandhiex tkun interpretata bħala differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli tar-rispons, iżda sempliċiment li l-valuri huma differenti matematikament.

Proċeduri ta' statistika

90. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analiżi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ponderata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-data dwar ir-rispons — eż. f'unitajiet probit jew logit jew Weibull (13), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli fid-dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet uniformi. Meta jkunu viċin iż-żero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistgħu

▼M7

jitkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analiżi (13). Għandu jiġi nnotat li l-metodi standard tal-analiżi li jużaw it-trasformazzjonijiet probit, logit jew Weibull huma maħsuba għall-użu fuq id-data kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u għandhom jiġu modifikati biex jakkomodaw ir-rata tat-tkabbir jew irendu d-dejta. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni tal-valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinsabu f'(14) (15) (16).

91. Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x. Il-limiti tal-kunfidenza ta' 95 % għal kull stima huma determinati u l-adegwatezza tad-dejta tar-rispons u l-mudell tar-rigressjoni għandhom jiġu evalwati jew grafikament jew statistikament. L-analiżi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament.

92. Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (18), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibli m'humiex xierqa għad-dejta.

93. Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa meħtieġ li jitqabblu l-medji ta' trattament permezz ta' analiżi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni mbagħad titqabbel mal-medja tal-kontroll bl-użu ta' metodu ta' ttestjar xieraq (eż. testijiet ta' Dunnett, Williams) (19) (20) (21) (22). Huwa meħtieġ li jiġi evalwat jekk l-assunzjoni ANOVA tad-distribuzzjoni normali (ND) u tal-omoġeneità tal-varjanza (VH) tal-varjanza iżżommx. Din l-evalwazzjoni għandha titwettaq bl-użu ta' test Shapiro-Wilks (ND) jew test Levene (VH). In-nuqqas li tinħalaq l-assunzjoni ta' ND u l-omoġeneità tal-varjanzi tista' xi kultant tiġi korretta bit-trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza u/jew tad-devjazzjoni minn ND hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bit-trasformazzjoni, l-analiżi b'metodi bħat-t-test Bonferroni-Welch, it-test step-down Jonkheere Terpstra u t-Test Bonferroni-Median għandhom jiġu kkunsidrati. F'(16) tista' tinstab gwida addizzjonali dwar id-determinazzjoni tal-NOEC.

IR-RAPPORTAR

94. Ir-rapport tat-test jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test

Sustanza monokostitwenti:

— dehra fiżika, solubbiltà fl-ilma, u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impuritajiet bħala xierqa u prattikament fattibbli, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— karatterizzati kemm jista' jkun bl-identità kimika (ara hawn fuq), okkorrenza kwantitattiva u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test

— l-isem xjentifiku u s-sors.

Kundizzjonijiet tat-test

— durata u kundizzjonijiet tal-faži tal-istabbilment;

— il-proċedura tat-test użata (statika, semistatika, ppulsata);

▼M7

— id-data tal-bidu tat-test u d-durata tiegħu.

— il-medium tat-test, jiġifieri s-sediment u l-medium tan-nutrijent likwidu;

— deskrizzjoni tad-disinn sperimentali: kompartiment/kamra tat-tkabbir jew laboratorju, reċipjenti tat-test u għotjien, volumi tas-soluzzjoni, tul u piż tal-pjanti tat-test għal kull reċipjent tat-test fil-bidu tat-test, proporzjon tal-wiċċ tas-sediment mal-wiċċ tal-ilma, proporzjon tal-volum tas-sediment u tal-ilma;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test (nominali u mkejla kif xierqa) u n-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni;

— metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u tat-test inkluż l-użu ta' kwalunkwe solvent jew aġent dispersiv;

— it-temperatura matul it-test;

— sors tad-dawl, irradjanza ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$)

— valuri pH tat-test u midja tal-kontroll kif ukoll id-dehra tal-midja tat-test fil-bidu u fit-tmiem tat-test;

— konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu;

— il-metodu tal-analiżi bid-dejta tal-valutazzjoni ta' kwalità xierqa (studji tal-validazzjoni, devjazzjonijiet standard jew limiti tal-kunfidenza ta' analiżijiet);

— metodi għad-determinazzjoni tal-varjabbli tal-kejl, eż., tul, piż niexef, piż frisk;

— id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-metodu ta' ttestjar.

Riżultati

— dejta mhux ipproċessata: tul tar-rimja u piż tar-rimja ta' pjanti/qasira u varjabbli tal-kejl oħra f'kull reċipjent tat-test u tal-kontroll f'kull osservazzjoni u okkażjoni tal-analiżi skont l-iskeda tal-evalwazzjoni pprovduta fit-Tabella 1;

— medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta' kejl;

— il-kurvi tat-tkabbir għal kull konċentrazzjoni;

— l-irduppjar tal-ħin/rata tat-tkabbir fil-kontroll ibbażat fuq it-tul tar-rimja u l-piż frisk inkluż il-koeffiċjent tal-varjazzjoni għar-rendiment tal-piż frisk;

— il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki;

— rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett;

— stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi għal varjabbli ta' rispons eż. EC_{50}, u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikunu kkalkolati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom.

— jekk tintuża ANOVA, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. id-differenza sinifikanti minima).

— kwalunkwe stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament.

▼M7

— kwalunkwe sinjal viżiva tal-fitotossiċità kif ukoll l-osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test.

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

TAGĦRIF

(1) Il-Kapitolu C.26 ta' dan l-Anness: Lemna sp. Test tal-Inibizzjoni mit-Tkabbir,.

(2) Il-Kapitolu C.3 ta' dan l-Anness: Alga tal-Ilma Ħelu u Ċjanobatterji, Test tal-Inibizzjoni tat-Tkabbir.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

(7) Il-Kapitolu C.50 ta' dan l-Anness: Sediment-free *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test.

(8) Il-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.

(11) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

Appendiċi 1

KOMPOŻIZZJONI TAL-MEDIUM SMART U BARKO

Komponent	L-ammont ta' reaġent miżjud mal-ilma (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (ekwilibriju fl-arja)	7,9

(*) ilma demineralizzat (jiġifieri distillat jew dejonizzat)

▼M7

Appendiċi 2

DEFINIZZJONIJIET

Bijomassa hija l-piż frisk u/jew niexef ta' materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test il-bijomassa hija s-somma tar-rimja prinċipali, tal-fergħat laterali kollha u tal-għeruq kollha.

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita.

Klorożi hija l-bidla tal-kulur minn aħdar għal sfurija tal-organiżmu tat-test speċjalment tas-sepali.

EC_x huwa l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test maħlula fil-medium tat-test li jirriżulta fi tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir tal- *Myriophyllum spicatum* f'perjodu ta' esponiment ddikjarat (li għandu jissemma espliċitament jekk ivarja mid-durata tat-test sħiħ jew normali). Biex tindika mingħajr ambigwità valur EC li jiġi derivat minn rata tat-tkabbir, is-simbolu "E_rC" jintuża għar-rata tat-tkabbir u "E_yC" jintuża għar-rendiment, segwit mill-varjabbli tal-kejl użat, eż. E_rC (tul tar-rimja prinċipali).

It-**tkabbir** huwa żieda fil-varjabbli tal-kejl, eż. tul tar-rimja prinċipali, l-ammont tal-fergħat laterali totali, it-tul tar-rimja totali, it-tul tal-għeruq totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru ta' sepali matul il-perjodu tat-test.

Ir-**rata tat-tkabbir** (rata ta' tkabbir speċifika medja) hija ż-żieda logaritmika fil-varjabbli tal-kejl waqt il-perjodu tal-esponiment. *Nota:* Il-varjabbli tar-rispons relatati mar-rata tat-tkabbir huma indipendenti mid-durata tat-test sakemm il-mudell tat-tkabbir ta' organiżmi tal-kontroll mhux esposti huwa esponenzjali.

Il-**Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC)** hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir (b'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'ħin ta' esponiment partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett ta' ħsara ugwali jew ogħla minn dawk osservati fil-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jistgħux jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni dettaljata għal kif il-LOEC (u b'hekk in-NOEC) intgħażlet.

Varjabbli tal-kejl huma kwalunkwe tip ta' varjabbli li huma mkejla biex jesprimu l-punt tat-tmiem tat-test bl-użu ta' wieħed jew aktar varjabbli tar-rispons differenti. F'dan il-metodu ta' ttestjar it-tul tar-rimja prinċipali, it-tul tal-fergħat laterali totali; it-tul tar-rimja prinċipali, it-tul tal-għeruq totali, il-piż frisk, il-piż xott u n-numru ta' sepali huma varjabbli tal-kejl.

Monokultura hija kultura bi speċi ta' pjanta waħda.

Nekrożi huwa tessut mejjet (jiġifieri abjad jew kannella skur) tal-organiżmu tat-test.

Il-**Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC)** hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taħt l-LOEC.

Varjabbli tar-rispons huwa varjabbli għall-istima tat-tossiċità derivata minn kwalunkwe varjabbli mkejjel li jiddeskrivi l-bijomassa b'metodi differenti tal-kalkolu. Għal dan il-metodu ta' ttestjar, ir-rata tat-tkabbir u r-rendiment huma varjabbli tar-rispons derivati minn varjabbli tal-kejl bħat-tul tar-rimja prinċipali, tul tar-rimja totali, piż frisk, piż niexef jew numru ta' sepali.

Test semistatiku (tiġdid) huwa test fejn is-soluzzjoni tat-test tiġi sostitwita perjodikament f'intervalli speċifiċi matul it-test.

Test statiku huwa metodu ta' ttestjar mingħajr tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

▼**M7**

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew taħlita li tiġi ttestjata billi jintuża dan il-metodu ta' ttestjar

Punt ta' tmiem tat-test jiddeskrivi l-fattur ġenerali li jinbidel b'mod relattiv għall-kontroll mis-sustanza kimika tat-test bħala mira tat-test. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-punt ta' tmiem tal-ittestjar hija l-inibizzjoni li tista' tiġi espressa b'varjabbli ta' rispons differenti li huma bbażati fuq varjabbli ta' kejl wieħed jew iktar.

Medium tat-test huwa medium ta' tkabbir sintetiku komplut li fuqu jikbru l-pjanti tal-ittestjar meta esposti għas-sustanza kimika tat-test. Is-sustanza kimika tat-test tinħall fil-medium tat-test.

UVCB hija sustanza ta' kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodott ta' reazzjoni kumplessa jew materjal bijoloġiku

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex tiġi espressa l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' esponiment li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' esponiment. *Nota:* Meta l-mudell tat-tkabbir ta' organiżmi mhux esposti huwa esponenzjali, il-varjabbli tar-rispons ibbażati fuq ir-rendiment se jonqsu matul id-durata tat-test.

▼**M8**

C.52. **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TA' ĠENERAZZJONI ESTIŻA WAĦDA TA' MEDAKA (MEOGRT)**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 240 tal-OECD (2015). It-Test ta' Ġenerazzjoni Estiża Waħda ta' Medaka (MEOGRT) jiddeskrivi metodu ta' ttestjar komprensiv ibbażat fuq ħut espost fuq diversi ġenerazzjonijiet biex jagħti *data* rilevanti għall-valutazzjoni tal-periklu u tar-riskju ekoloġiċi tas-sustanzi kimiċi, inklużi sustanzi kimiċi interferenti endokrinali suspettati (EDCs). L-esponiment fil-MEOGRT jibqa' sat-tifqis (sa ġimagħtejn wara l-fertilizzazzjoni, wpf) fit-tieni ġenerazzjoni (F2). Ikunu meħtieġa investigazzjonijiet addizzjonali biex tiġi ġustifikata l-utilità tal-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2 lil hinn mit-tifqis; għalissa m'hemmx biżżejjed informazzjoni biex jiġu pprovduti l-kundizzjonijiet jew il-kriterji rilevanti għall-ġustifikazzjoni tal-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2. Madankollu, dan il-metodu ta' ttestjar jista' jiġi aġġornat hekk kif jiġu kkunsidrati informazzjoni u *data* ġodda. Pereżempju, gwida dwar l-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2 permezz tar-riproduzzjoni tista' tkun potenzjalment siewja f'ċerti ċirkustanzi (eż. sustanzi kimiċi b'potenzjal għoli ta' bijokonċentrazzjoni jew b'indikazzjonijiet ta' effetti transġenerazzjonali f'unitajiet tassonomiċi oħra). Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża biex jiġu evalwati l-effetti kroniċi potenzjali tas-sustanzi kimiċi, inklużi sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali, fuq il-ħut. Il-metodu jixħet enfasi primarja fuq l-effetti rilevanti potenzjali fuq il-popolazzjoni (jiġifieri, impatti avversi fuq is-sopravivenza, l-iżvilupp, it-tkabbir u r-riproduzzjoni) għall-kalkolu ta' Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) jew Konċentrazzjoni ta' Effett (Ecx), għalkemm ta' min jinnota li l-approċċi tal-ECx raramen ikunu xierqa għal studji kbar ta' dan it-tip fejn iż-żieda tan-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test biex tkun tista' tiġi determinata l-ECx mixtieqa tista' tkun imprattika, u dan jista' jikkawża wkoll tħassib sinifikanti relatat mal-benessri tal-annimali minħabba n-numru kbir ta' annimali użati. Għal sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux valutazzjoni fuq "diversi ġenerazzjonijiet" jew sustanzi kimiċi li mhumiex sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali, metodi ta' ttestjar oħra jaf ikunu aktar adattati (1). Il-medaka hi l-ispeċi xierqa għall-użu f'dan il-metodu ta' ttestjar, fid-dawl taċ-ċiklu tal-ħajja qasir tagħha u tal-possibbiltà li jiġi determinat is-sess ġenetiku tagħha (2), li hu meqjus komponent kritiku f'dan il-metodu ta' ttestjar. Il-metodi speċifiċi u l-punti ta' tmiem osservazzjonali spjegati f'dan il-metodu huma applikabbli għall-medaka biss. Speċijiet oħra ta' ħut żgħir (eż. żebra) jistgħu jkunu adattati għal protokoll tat-test simili.

2. Dan il-metodu ta' ttestjar ikejjel diversi punti ta' tmiem bijoloġiċi. Tingħata enfasi primarja lill-effetti avversi potenzjali fuq il-parametri rilevanti għall-popolazzjoni inklużi s-sopravivenza, l-iżvilupp gross, it-tkabbir u r-riproduzzjoni. It-tieni nett, biex tiġi pprovduta informazzjoni mekkanistika u tiġi pprovduta konnessjoni bejn ir-riżultati minn tipi oħra ta' studji fuq il-post u fil-laboratorju, fejn ikun hemm evidenza *a posteriori* li sustanza kimika jkollha attività potenzjali ta' interferenza endokrinali (*eż.* attività androġenika jew estroġenika f'testijiet u f'assaġġi oħra), informazzjoni siewja oħra tinkiseb bil-kejl tal-mRNA tal-*vitelloġenina* (*vtg)* (jew il-proteina tal-vitelloġenina, il-VTG), tal-karatteristiċi sesswali sekondarji (SSC) fenotipiċi relatati mas-sess ġenetiku, u bl-evalwazzjoni tal-istopatoloġija. Ta' min jinnota li jekk sustanza kimika tat-test jew il-metaboliti tagħha ma jkunux suspettati li jkunu EDCs, jaf ma jkunx hemm bżonn li jitkejlu dawn il-punti ta' tmiem sekondarji u jaf ikun aktar xieraq li jintużaw studji anqas intensivi fl-użu ta' riżorsi u ta' annimali (1). Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

▼M8

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Minħabba n-numru limitat ta' sustanzi kimiċi ttestjati u ta' laboratorji involuti fil-validazzjoni ta' dan l-assaġġ kemxejn kumpless, hu antiċipat li la jkun hemm numru suffiċjenti ta' studji disponibbli biex jiġi żgurat l-impatt ta' dan id-disinn il-ġdid tal-istudju, il-metodu ta' ttestjar jiġi rieżaminat u, jekk ikun hemm bżonn, rivedut, fid-dawl tal-esperjenza miksuba. Id-*data* tista' tintuża fil-Livell 5 tal-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (3). Il-metodu ta' ttestjar jibda bl-esponiment ta' ħut adult (il-ġenerazzjoni F0) għas-sustanza kimika tat-test matul il-fażi ta' riproduzzjoni. L-esponiment ikompli matul l-iżvilupp u r-riproduzzjoni fl-F1 u t-tifqis fil-ġenerazzjoni F2; b'hekk, l-assaġġ jippermetti l-evalwazzjoni tal-perkorsi endokrinali strutturali kif ukoll attivazzjonali. Jista' jintuża approċċ tal-piż tal-evidenza meta jiġu interpretati l-punti ta' tmiem relatati mas-sistema endokrinali.

4. It-test għandu jinkludi numru adegwat ta' individwi biex tiġi żgurata saħħa suffiċjenti għall-evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem rilevanti għar-riproduzzjoni (ara l-Appendiċi 3) filwaqt li jiġi żgurat li n-numru ta' annimali użati jkun il-minimu meħtieġ għal raġunijiet ta' benessri tal-annimali. Fid-dawl tan-numri kbar ta' annimali tat-test użati, importanti li tiġi kkunsidrata bir-reqqa l-ħtieġa għat-test b'rabta mad-*data* eżistenti li diġà jaf ikun fiha informazzjoni rilevanti fuq ħafna mill-punti ta' tmiem fl-MEOGRT. Xi għajnuna f'dan ir-rigward tista' tinkiseb mill-Qafas tal-OECD għall-Ittestjar tat-Tossiċità tal-Ħut (1).

5. Il-metodu ta' ttestjar tfassal primarjament biex jiddistingwi l-effetti ta' sustanza waħda. Madankollu, jekk ikun hemm bżonn li jsir test fuq taħlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk dan hux se jipprovdi riżultati aċċettabbli għall-fini regolatorju maħsub.

6. Qabel ma jinbeda t-test, importanti li wieħed ikollu informazzjoni dwar il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, b'mod partikolari biex ikunu jistgħu jiġu prodotti soluzzjonijiet kimiċi stabbli. Hu neċessarju wkoll li jkun hemm metodu analitiku sensittiv b'mod adegwat għall-verifika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. It-test jinbeda bl-esponiment ta' rġiel u ta' nisa sesswalment maturi (tal-anqas 12-il wpf) f'pari tat-tgħammir għal tliet ġimgħat, li matulhom is-sustanza kimika tat-test titqassam fl-organiżmu tal-ġenerazzjoni tal-ġenituri (F0) skont l-imġiba tossikokinetika tagħha. L-aktar qrib possibbli tal-ewwel jum tar-raba' ġimgħa, il-bajd jinġabar biex tinbeda l-ġenerazzjoni F1. Matul it-trobbija tal-ġenerazzjoni F1 (15-il ġimgħa b'kollox), jiġu vvalutati l-kapaċità ta' tifqis u s-sopravivenza. Barra minn hekk, jittieħed kampjun tal-ħut wara 9-10 wpf għall-punti ta' tmiem tal-iżvilupp u r-riproduzzjoni tiġi vvalutata għal tliet ġimgħat mit-12 sal-14-il wpf. Ġenerazzjoni F2 tinbeda wara t-tielet ġimgħa tal-valutazzjoni tar-riproduzzjoni u titrabba sat-tlestija tat-tifqis.

KRITERJI TA' VALIDITÀ TAT-TEST

8. Japplikaw il-kriterji li ġejjin għall-validità tat-test:

— Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun ≥ 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja matul it-test;

— It-temperatura medja tal-ilma tul id-durata sħiħa tal-istudju għandha tkun ta' bejn 24 u 26 °C. Ħarġiet qosra mill-medja skont l-akkwarji individwali ma għandhomx ikunu aktar minn 2 °C;

▼M8

— Il-fekonditá medja tal-kontrolli f'kull waħda mill-ġenerazzjonijiet (F0 u F1) għandha tkun akbar minn 20 bajda għal kull par kull jum. Il-fertilità tal-bajd kollu prodott matul il-valutazzjoni għandha tkun akbar minn 80 %. Barra minn hekk, 16 mill-24 par tat-tnissil tal-kontroll rakkomandati (> 65 %) għandhom jipproduċu aktar minn 20 bajda għal kull par kull jum;

— Il-kapaċità ta' tifqis tal-bajd għandha tkun ≥ 80 % (medja) fil-kontrolli (f'kull waħda mill-ġenerazzjonijiet F1 u F2);

— Is-sopravivenza wara t-tifqis sa 3 wpf u minn 3 wpf sat-terminazzjoni għall-ġenerazzjoni F1 (jiġifieri 15-il wpf) għandha tkun ≥ 80 % (medja) u ≥ 90 % (medja), rispettivament fil-kontrolli (F1);

— Għandha tkun disponibbli evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla.

Rigward it-temperatura tal-ilma, filwaqt li din mhix kriterju tal-validità, repliki fi ħdan trattament ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin, u l-gruppi ta' trattament fi ħdan test ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin (fuq il-bażi tal-kejlijiet tat-temperatura ta' kuljum, u esklużi ħarġiet qosra).

9. Għalkemm tista' tiġi osservata riproduzzjoni mnaqqsa fil-gruppi ta' esponiment ogħla, għandu jkun hemm riproduzzjoni suffiċjenti tal-anqas fit-tielet l-ogħla grupp u fil-gruppi inferjuri kollha ta' F0 biex jimtlew l-inkubaturi tat-tifqis. Barra minn hekk, għandu jkun hemm sopravivenza embrijonka adegwata fit-tliet gruppi bl-ogħla u bl-anqas esponiment fl-F1 biex tkun tista' ssir evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem fil-kampjunar subadult (ara l-paragrafi 36 u 38 u l-Appendiċi 9). Barra minn hekk, tal-anqas għandu jkun hemm sopravivenza minima wara t-tifqis (~20 %) fit-tieni l-ogħla grupp ta' esponiment tal-F1. Dawn mhumiex kriterji ta' validità per se, iżda rakkomandazzjonijiet biex ikunu jistgħu jiġu kkalkolati NOECs robusti.

10. Jekk tiġi osservata devjazzjoni mill-kriterji ta' validità tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tar-riżultati tat-test u dawn id-devjazzjonijiet u l-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapport tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

11. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

(a) ossiġenu u apparati li jkejlu l-pH;

(b) tagħmir għad-determinazzjoni tal-ebusija u tal-alkalinità tal-ilma;

(c) apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment monitoraġġ kontinwu;

(d) tankijiet magħmula minn materjal kimiku inerti u b'kapaċità adattata b'rabta mad-densità rrakkomandata tat-tagħbija u tal-istokkjar (ara l-Appendiċi 3);

(e) bilanċ preċiż biżżejjed (jiġifieri preċiż sa ± 0,5 mg).

▼M8

L-ilma

12. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwat fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Biex jiġi żgurat li l-lima tad-dilwizzjoni ma jkollux influwenza żejda fuq ir-riżultat tat-test (pereżempju b'kumplessazzjoni tas-sustanza kimika tat-test) jew ma jaffettwax b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk riproduttiv, għandhom jittieħdu kampjuni f'intervalli għall-analiżi. Għandu jsir il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), il-pestiċidi, il-karbonju organiku totali u s-solidi sospiżi, pereżempju, kull sitt xhur meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li jkun relattivament kostanti fil-kwalità. Ċerti karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' ± 0,5 unitajiet tal-pH.

Sistema ta' esponiment

13. Id-disinn u l-materjali użati għas-sistema ta' esponiment mhumiex speċifikati. Ħġieġ, azzar inossidabbli, jew materjal kimikament inerti ieħor għandu jintuża għall-bini tas-sistema tat-test li ma tkunx ġiet kontaminata matul it-testijiet preċedenti. Għall-fini ta' dan it-test, sistema ta' esponiment xierqa tista' tkun tikkonsisti f'sistema bi fluss kontinwu (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Is-soluzzjonijiet tat-test

14. Is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandha titwassal fis-sistema ta' esponiment b'pompa xierqa. Ir-rata ta' fluss tas-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi kalibrata skont konferma analitika tas-soluzzjonijiet tat-test qabel it-tnedija tal-esponiment, u tiġi verifikata volumetrikament kull ċertu żmien matul it-test. Is-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment tiġġedded b'mod adegwat (eż. il-volum jiġġedded għal ħames darbiet kuljum sa 16-il tiġdid kuljum jew fluss sa 20 ml/min) skont l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test u l-kwalità tal-ilma.

15. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jitħejjew billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija preferibbilment għandha titħejja billi sempliċiment titħallat jew titħawwad is-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni b'mezzi mekkaniċi (eż. bit-tħawwid jew bl-ultrasonikazzjoni). Jistgħu jintużaw kolonni/sistemi ta' saturazzjoni jew metodi ta' dożaġġ passiv (14) biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Għandu jittieħed kull sforz biex jiġu evitati solventi jew trasportaturi għaliex: (1) ċerti solventi nfushom jistgħu jirriżultaw f'tossiċità u/jew f'risponsi mhux mixtieqa jew mhux mistennija, (2) l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi f'livell ogħla mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom (hekk kif spiss jista' jseħħ bl-użu tas-solventi) jista' jirriżulta f'determinazzjonijiet impreċiżi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, (3) l-użu ta' solventi f'testijiet aktar fit-tul jista' jirriżulta fi grad sinifikanti ta' "biofilming" assoċjata ma' attività mikrobika li tista' tħalli impatt fuq il-kundizzjonijiet ambjentali kif ukoll fuq il-ħila li jinżammu l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment u (4) fl-assenza ta' *data* storika li turi li s-solvent ma jinfluwenzax l-eżitu tal-istudju, l-użu ta' solventi jeħtieġ trattament ta' kontroll b'solvent li għandu implikazzjonijiet fuq il-benessri tal-annimali peress li jkunu meħtieġa annimali addizzjonali biex isir it-test. Għal sustanzi kimiċi li diffiċli tittestjahom, solvent jista' jintuża bħala l-aħħar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida 23 tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akkwatika ta' Sustanzi u ta' Taħlitiet Diffiċli (15) biex jiġi determinat l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent se tiġi determinata mill-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test u mid-disponibbiltà ta' *data* storika dwar l-użu tas-solvent. Jekk jintużaw trasportaturi tas-solvent, għandhom jiġu evalwati kontrolli b'solvent xierqa minbarra kontrolli (negattivi) mhux b'solvent (ilma ta' dilwizzjoni biss). F'każ li l-użu ta' solvent ma jkunx evitabbli, u sseħħ attività mikrobika (biofilming), hu rakkomandat li jinżamm rekord/li jiġi rapportat dwar il-biofilming għal kull tank (tal-anqas kull ġimgħa) matul it-test sħiħ.

▼M8

Idealment, il-konċentrazzjoni tas-solvent għandha tinżamm kostanti fil-kontroll b'solvent u fit-trattamenti kollha tat-test. Jekk il-konċentrazzjoni tas-solvent ma tinżammx kostanti, għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni tas-solvent fit-trattament tat-test fil-kontroll b'solvent. F'każijiet li fihom jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet massimi tas-solvent ma għandhomx jaqbżu l-100 µl/l jew 100 mg/l (15), u hu rakkomandat li l-konċentrazzjoni b'solvent tinżamm għall-anqas livell possibbli (*eż.* < 20 µl/l) biex jiġi evitat effett potenzjali tas-solvent fuq il-punti ta' tmiem imkejla (16).

L-annimali tat-test

Għażla u żamma tal-ħut

16. L-ispeċi tat-test hi l-medaka *Oryzias latipes* minħabba ċ-ċiklu tal-ħajja qasir tagħha u l-possibbiltà li jiġi determinat is-sess ġenetiku. Għalkemm speċijiet oħra ta' ħut żgħir jistgħu jkunu adattati għal protokoll tat-test simili, il-metodi speċifiċi u l-punti ta' tmiem osservazzjonali spjegati f'dan il-metodi ta' ttestjar huma applikabbli għall-medaka biss (ara l-paragrafu 1). Il-medaka tiġi indotta minnufih biex titnissel f'kaptività; jeżistu metodi ppubblikati għall-koltura tagħha (17) (18) (19), u hemm *data* disponibbli minn testijiet tal-letalità fuq terminu qasir tal-istadju bikri tal-ħajja u taċ-ċiklu sħiħ tal-ħajja (5) (6) (8) (9) (20). Il-ħut kollu jinżamm fuq fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl:8 sigħat dlam. Il-ħut jintema' gambli ħaj tal-ilma mielaħ, *Artemia* spp., li jistgħu jiġu supplimentati b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn. L-ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli għandu jiġi analizzat b'mod regolari għall-kontaminanti.

17. Dment li jiġu segwiti prattiki xierqa tat-trobbija, ma jkun meħtieġ ebda protokoll speċifiku tal-koltura. Pereżempju, il-medaka tista' titrabba f'tankijiet taż-2 l b'240 ħuta larva f'kull tank sar-4 wpf, u mbagħad jistgħu jitrabbew f'tankijiet taż-2 l b'10 ħutiet f'kull tank sat-8 wpf, meta dawn jiġu trasferiti f'tankijiet taż-2 l f'pari tat-tgħammir.

Akklimazzjoni u għażla tal-ħut

18. Il-ħut tat-test għandu jintgħażel minn stokk wieħed tal-laboratorju li jkun tħalla jderri għal tal-anqas ġimagħtejn qabel it-test fil-kondizzjonijiet ta' kwalità tal-ilma u ta' illuminazzjoni li jkunu simili għal dawk użati fit-test (Nota: Dan il-perjodu ta' akklimazzjoni mhuwiex perjodu ta' qabel l-esponiment *in situ*). Hu rakkomandat li l-ħut tat-test jinkiseb minn koltura interna, peress li t-trasport ta' ħut adult hu stressanti u jista' jtellef ir-riproduzzjoni affidabbli. Il-ħut għandu jintema' nauplii tal-gambli tal-ilma mielaħ darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' żamma kollu u matul il-fażi ta' esponiment kollha, supplimentat b'ikel fil-forma ta' laqx disponibbli kummerċjalment jekk ikun hemm bżonn. Tal-anqas 42 par tat-tgħammir (54 par tat-tgħammir jekk ikun meħtieġ kontroll b'solvent minħabba, parzjalment, nuqqas ta' *data* storika li ssostni l-użu tal-kontroll mhux b'solvent biss) huma meqjusa neċessarja biex jinbeda dan it-test bl-għan li tiġi żgurata replika adegwata. Barra minn hekk, kull par tat-tgħammir ta' F0 għandu jiġi verifikat li jkun XX-XY (jiġifieri komplement normali ta' kromożomi as-sess f'kull sess) biex tiġi evitata l-inklużjoni possibbli ta' rġiel XX spontanji (ara l-paragrafu 39).

▼M8

19. Minħabba l-fażi ta' akklimazzjoni, il-mortalitajiet fil-ħut tal-koltura għandhom jiġu reġistrati u għandhom jiġu applikati l-kriterji li ġejjin wara perjodu ta' ssetiljar ta' 48 siegħa:

— Mortalijiet akbar minn 10 % tal-popolazzjoni tal-koltura f'sebat ijiem qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: irrifjuta l-lott sħiħ;

— Mortalijiet ta' bejn 5 % u 10 % tal-popolazzjoni fis-sebat ijiem ta' qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: akklimazzjoni għal sebat ijiem addizzjonali għall-perjodu ta' akklimazzjoni ta' ġimagħtejn (2); jekk ikun hemm mortalità akbar minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, irrifjuta l-lott kollu;

— Mortalijiet ta' anqas minn 5 % tal-popolazzjoni fis-sebat ijiem ta' qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: aċċetta l-lott.

20. Il-ħut ma għandux jirċievi trattament għal mard fil-perjodu ta' akklimazzjoni ta' ġimagħtejn qabel it-test u matul il-perjodu ta' esponiment, u t-trattament tal-mard għandu jiġi evitat għalkollox jekk dan ikun possibbli. Ħut b'sinjali kliniċi ta' mard ma għandux jintuża fl-istudju. Għandu jinżamm rekord ta' osservazzjonijiet u ta' kwalunkwe trattament profilattiku u terapewtiku tal-mard matul il-perjodu tal-koltura ta' qabel it-test.

21. Il-fażi ta' esponiment għandha tinbeda b'ħut adult sesswalment dimorfiku u mqassam skont is-sess ġenetiku minn provvista mil-laboratorju ta' annimali maturi riproduttivament kolturati f'25 ± 2 °C. Il-ħut għandu jiġi identifikat bħala nissiel ipprovat (jiġifieri jkun ipproduċa wlied vijabbli) matul il-ġimgħa ta' qabel l-esponiment. Għall-grupp kollu ta' ħut użat fit-test, il-medda tal-piżijiet individwali skont is-sess fil-bidu tat-test għandha tinżamm fi ħdan ± 20 % tal-piż medju aritmetiku tal-istess sess. Subkampjun tal-ħut għandu jintiżen qabel it-test biex jiġi stmat il-piż medju. Il-ħut magħżul għandu jkollu tal-anqas 12-il wpf, ikun jiżen ≥ 300 mg għan-nisa u ≥ 250 mg għall-irġiel.

DISINN TAT-TEST

Konċentrazzjonijiet tat-test

22. Hu rakkomandat li jintużaw ħames konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi flimkien mal-kontroll(i). Is-sorsi kollha ta' informazzjoni għandhom jiġu kkunsidrati meta tingħażel il-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, inklużi r-relazzjonijiet kwantitattivi bejn l-istruttura u l-attività (QSARs), ir-read-across minn analogi, ir-riżultati tat-testijiet fuq il-ħut bħal assaġġi tat-tossiċità akuta (il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness), l-assaġġ dwar ir-riproduzzjoni fuq terminu qasir tal-ħut (il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness) u metodi ta' ttestjar oħra, eż. il-Kapitoli C.15, C.37, C.41, C.47 jew C.49 ta' dan l-Anness (21) (22) (23) (24) (25) (26) jekk disponibbli, jew jekk ikun hemm bżonn, minn test ta' sejbien tal-medda, possibilment inkluża fażi ta' riproduzzjoni. Jekk ikun hemm bżonn, it-test ta' sejbien tal-medda jista' jsir f'kundizzjonijiet (kwalità tal-ilma, sistema tat-test, tgħabbija tal-annimali) simili għal dawk użati għat-test definittiv. Jekk l-użu ta' solvent ikun neċessarju u ma jkun hemm ebda *data* storika disponibbli, it-test ta' sejbien tal-medda jista' jintuża biex jidentifika x-xerqien tas-solvent. L-ogħla konċentrazzjoni tat-test ma għandhiex taqbeż is-solubbiltà fl-ilma, 10 mg/l jew 10 % tas-96h-LC50 (27). L-anqas konċentrazzjoni għandha tkun fattur

▼M8

ta’ 10 sa 100 darba anqas mill-ogħla konċentrazzjoni. L-użu ta’ ħames konċentrazzjonijiet f’dan it-test jippermetti mhux biss li jitkejlu r-relazzjonijiet bejn id-doża u r-rispons, iżda jipprovdi wkoll il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) u l-NOEC li huma neċessarji għall-valutazzjoni tar-riskju f’ċerti programmi regolatorji jew ġurisdizzjonijiet. Ġeneralment, il-fattur ta’ spazjar bejn il-konċentrazzjonijiet nominali tas-sustanza kimika tat-test bejn il-livelli ta’ trattament adjaċenti jkun ≤ 3,2.

Repliki fi ħdan gruppi ta’ trattament u kontrolli

23. Tal-anqas għandhom jintużaw sitt kompartimenti tat-test repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test (ara l-Appendiċi 7). Matul il-fażi riproduttiva (ħlief il-ġenerazzjoni F0), l-istruttura tar-replika tirdoppja għall-valutazzjoni tal-fekondità u kull replika jkollha par tat-tnissil wieħed biss (ara l-paragrafu 42).

24. Minbarra l-konċentrazzjonijiet tat-test, għandhom isiru kontroll bl-ilma ta’ dilwizzjoni u, jekk meħtieġ, kontroll b’solvent. Għandu jintuża numru rdoppjat ta’ kompartimenti repliki għall-kontrolli biex tiġi żgurata saħħa statistika adegwata (jiġifieri tal-anqas għandhom jintużaw tnax-il replika għall-kontrolli). Matul il-fażi riproduttiva, in-numru ta’ repliki fil-kontrolli jirdoppja (jiġifieri 24 replika bħala minimu u kull replika jkollha par tat-tgħammir wieħed biss). Wara r-riproduzzjoni, ir-repliki tal-kontroll ma għanudx ikun fihom aktar minn 20 embrijun (ħut).

PROĊEDURA

Tnedija tat-test

25. Il-ħut adult riproduttivament attiv użat biex tinbeda l-ġenerazzjoni F0 tat-test jintgħażel fuq il-bażi ta’ żewġ kriterji: l-età (tipikament aktar minn 12-il wpf iżda hu rakkomandat li ma jinqabżux is-16-il wpf) u l-piż (għandu jkun ≥ 300 mg għan-nisa u ≥ 250 mg għall-irġiel).

26. Il-pari mara-raġel li jissodisfaw l-ispeċifikazzjonijiet imsemmija hawn fuq jitmexxew bħala pari individwali f’kull replika tat-tank, jiġifieri tnax-il replika f’kontrolli u sitt repliki fi trattamenti kimiċi fil-bidu tat-test. Dawn it-tankijiet jiġu assenjati trattament b’mod aleatorju (eż. T1-T5 u kontroll) u replika (eż. A-L fil-kontrolli u A-F fit-trattament), u mbagħad jitqiegħdu fis-sistema ta’ esponiment bil-fluss xieraq f’kull tank.

Il-kundizzjonijiet tal-esponiment

27. Sommarju sħiħ tal-parametri tat-test u tal-kundizzjonijiet jista’ jinstab fl-Appendiċi 3. L-aderenza ma’ dawn l-ispeċifikazzjonijiet għandha tirriżulta f’ħut tal-kontroll b’valuri tal-punt ta’ tmiem simili għal dawk elenkati fl-Appendiċi 4.

28. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, il-pH u t-temperatura għandhom jitkejlu f’tal-anqas reċipjent wieħed tat-test ta’ kull grupp tat-trattament u tal-kontroll. Tal-anqas, dawn il-kejlijiet, ħlief it-temperatura, għandhom isiru darba fil-ġimgħa matul il-perjodu ta’ esponiment kollu. It-temperatura medja tal-ilma matul id-durata sħiħa tal-istudju għandha tkun bejn 24 u 26 °C matul it-test sħiħ. It-temperatura għandha titkejjel kuljum matul il-perjodu ta’ esponiment. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta’ 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f’medda ta’ ± 0,5 unitajiet tal-pH. Repliki fi ħdan trattament ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin, u l-gruppi ta’ trattament fi ħdan test ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin (fuq il-bażi tal-kejlijiet tat-temperatura ta’ kuljum, u eskluži ħarġiet qosra).

▼M8

Durata tal-esponiment

29. It-test jesponi ħut sesswalment riproduttiv mill-F0 għal tliet ġimgħat. Fil-ġimgħa 4, bejn wieħed u ieħor fil-jum 24 tat-test, l-F1 tiġi stabbilita u l-pari tat-tgħammir F0 jinqatlu bl-ewtanażja u jittieħed rekord tal-piż u tat-tul (ara l-Paragrafu 34). Dan hu segwit minn esponiment tal-ġenerazzjoni F1 għal aktar minn 14-il ġimgħa oħra (total ta' 15-il ġimgħa għall-F1) u tal-ġenerazzjoni F2 għal ġimagħtejn sat-tifqis. Id-durata totali tat-test hi primarjament ta' 19-il ġimgħa (jiġifieri sat-tifqis tal-F2). L-iskedi ta' żmien għat-test huma murija fit-Tabella 2 u spjegati aktar f'dettall fl-Appendiċi 9.

Reġim tal-għalf

30. Il-ħut jista' jitgħalef il-gambli tal-ilma mielaħ *Artemia* spp. (nauplii li jkollhom 24 siegħa) *ad libitum*, supplimentati b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn. L-ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli għandu jiġi analizzat b'mod regolari għal kontaminanti bħal pestiċidi organokloriniċi, idrokarburi aromatiċi poliċikliċi (PAHs), poliklorobifenili (PCBs). Ikel b'livell elevat ta' sustanzi attivi endokrinalment (jiġifieri fitoestroġeni) li jistgħu jxekklu r-rispons tat-test għandhom jiġu evitati. Ikel mhux mikul u materjal tar-rawt għandhom jitneħħew mir-reċipjenti tat-test skont il-bżonn, eż. billi jitnaddaf il-qiegħ ta' kull tank permezz ta' sifun. Il-ġnub u l-qiegħ ta' kull tank għandhom jitnaddfu wkoll darba jew darbtejn fil-ġimgħa (eż. bil-brix bi spatula). Fl-Appendiċi 5 jingħata eżempju tal-iskeda tat-tagħlif. Ir-rata tat-tagħlif hi bbażata fuq in-numru ta' ħut għal kull replika. Għaldaqstant, ir-rata tat-tagħlif tonqos jekk ikun hemm il-mortalitajiet f'replika.

Determinazzjoni u kejlijiet analitiċi

31. Qabel jibda l-perjodu ta' esponiment, għandu jiġi żgurat li s-sistema tat-twassil tas-sustanza kimika taħdem kif suppost. Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi meħtieġa kollha, inkluż għarfien suffiċjenti dwar l-istabbiltà tas-sustanza kimika fis-sistema tat-test. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli xierqa, idealment tal-anqas kull ġimgħa f'replika waħda għal kull grupp tat-trattament, b'rotazzjoni bejn ir-repliki tal-istess grupp tat-trattament kull ġimgħa.

32. Matul it-test, ir-rati tal-fluss tad-dilwent u tas-soluzzjoni ewlenija għandhom jiġu verifikati f'intervalli kif xieraq (eż. tal-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa). Hu rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla. F'każ ta' sustanzi kimiċi li jakkumulaw b'mod sinifikanti fil-ħut, il-konċentrazzjonijiet tat-test jistgħu jonqsu hekk kif jikber il-ħut. F'każijiet bħal dawn, hu rakkomandat li r-rata ta' tiġdid tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment tiġi adattata biex il-konċentrazzjonijiet tat-test jinżammu l-aktar kostanti possibbli.

Osservazzjonijiet u punti ta' tmiem imkejla

33. Il-punti ta' tmiem imkejla jinkludu l-fekonditá, il-fertilitá, it-tifqis, it-tkabbir u s-sopravivenza għall-evalwazzjoni tal-effetti possibbli fil-livell tal-popolazzjoni. L-osservazzjonijiet tal-imġiba għandhom isiru ta' kuljum ukoll, u kwalunkwe mġiba mhux tas-soltu għandha tiġi notata. Punti ta' tmiem mekkanistiċi oħra jinkludu l-livelli tal-proteini epatiċi tal-mRNA *vtg* jew tal-VTG b'immunoassaġġ (28), markaturi fenotipiċi sesswali bħall-papilli karatterisiċi tal-papilli tal-pinen anali tal-irġel, evalwazzjoni istoloġika tas-sess gonadali, u evalwazzjoni istopatoloġika tal-kilwa, tal-fwied u tal-gonad (ara l-lista ta' punti ta' tmiem fit-Tabella 1). Dawn il-punti ta' tmiem speċifiċi kollha jiġu evalwati fil-kuntest ta' determinazzjoni tas-sess ġenetiku tal-individwu, fuq il-bażi tal-preżenza jew tal-assenza tad-*dmy* tal-ġene li jiddetermina s-sess

▼M8

masiki tal-medaka (ara l-paragrafu 41). Barra minn hekk, il-proporzjonijiet sempliċi tas-sessi fenotipiċi jistgħu jinkisbu bl-użu tal-informazzjoni mill-għadd ta' papilli tal-pinen anali biex medaka individwali jiġu definiti bħala fenotipikament irġiel jew nisa. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jkunx mistenni jindividwa devjazzjonijiet modesti mill-proporzjon mistenni tas-sessi peress li n-numri relattivament żgħar ta' ħut għal kull replika mhux se jipprovdi biżżejjed saħħa statistika. Barra minn hekk, matul il-valutazzjoni istopatoloġika, il-gonad jiġi evalwat u jsiru analiżijiet ferm aktar b'saħħithom għall-valutazzjoni tal-fenotip tal-gonad fil-kuntest tas-sess ġenetiku.

34. L-iskop primarju ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jivvaluta l-effetti potenzjali rilevanti għall-popolazzjoni ta' sustanza kimika tat-test. Il-punti ta' tmiem mekkanistiċi (VTG, SSCs u ċerti effetti tal-istopatoloġija gonadali) jistgħu jassistu wkoll fid-determinazzjoni ta' jekk xi effett huwiex medjat b'xi attività endokrinali. Madankollu, dawn il-punti ta' tmiem mekkanistiċi jistgħu jkunu influwenzati wkoll minn tossiċitajiet sistemiċi u oħrajn. Konsegwentement, l-istopatoloġija tal-fwied u tal-kliewi tista' tiġi vvalutata wkoll f'dettall biex jinftiehem aħjar kwalunkwe rispons f'punti ta' tmiem mekkanistiċi. Madankollu, jekk ma jsirux dawn l-evalwazzjonijiet dettaljati, anormalitajiet grossi osservati b'mod inċidentali matul l-evalwazzjoni istopatoloġika xorta waħda għandhom jiġu nnotati u rapportati.

Il-qtil bl-ewtanażja tal-ħut

35. Fit-terminazzjoni tal-esponiment tal-ġenerazzjoni F0 u F1, u meta jittieħed kampjun tal-ħut subadult, il-ħut għandu jiġi ewtanizzat b'ammonti xierqa ta' soluzzjoni anestetika (eż. Trikaina metan sulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l) baferjata bi 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonat tas-sodju, CAS.144-55-8) biex titnaqqas l-irritazzjoni tal-membrana mukuża. Jekk il-ħut ikun qed juri sinjali tac tbatija konsiderevoli (serji ħafna u l-mewt tista' titbassar b'mod affidabbli) u jitqies moribund, l-annimali għandhom jiġu anestetizzati u ewtanizzati u trattati bħala mortalità għall-analiżi tad-*data*. Meta ħuta tiġi ewtanizzata minħabba morbiditá, dan għandu jiġi notat u rapportat. Skont meta l-ħuta tiġi ewtanizzata matul l-istudju, il-ħuta tista' tinżamm għall-analiżi tal-istopatoloġija (iffissar tal-ħuta għall-istopatoloġija possibbli).

Immaniġġjar tal-bajd u tal-ħut larvali

Il-ġbir tal-bajd minn pari tat-tnissil biex tiġi propagata l-ġenerazzjoni li jmiss

36. Il-ġbir tal-bajd isir fl-ewwel jum (jew fl-ewwel jumejn, jekk ikun hemm bżonn) tal-Ġimgħa 4 tat-Test għall-proċediment mill-F0 għall-F1 u tal-Ġimgħa 18 tat-Test għall-proċediment mill-F1 għall-F2. Il-Ġimgħa 18 tat-Test tikkorrispondi għal ħut adult tal-F1 li jkollu 15-il wpf (ġimgħat wara l-fertilizzazzjoni). Importanti li l-bajd kollu jitneħħa minn kull tank jum qabel ma jibda l-ġbir tal-bajd biex jiġi żgurat li l-bajd kollu miġbur minn par tat-tnissil ikun ġej minn riproduzzjoni waħda. Wara r-riproduzzjoni, il-medaka mara kultant iġġorr il-bajd tagħha qrib il-feṫa sakemm il-bajd ikun jista' jiġi depożitat fuq substrat. B'ebda substrat preżenti fit-tank, il-bajd jista' jinstab jew imqabbad mal-mara jew fil-qiegħ tat-tank. Skont il-post tiegħu, il-bajd jitneħħa bir-reqqa mill-mara jew jinġibed b'sifun mill-qiegħ fil-Ġimgħa 4 tat-Test tal-F0 u fil-Ġimgħa 18 tat-Test tal-F1. Il-bajd kollu miġbur fi ħdan trattament jinġabar flimkien qabel id-distribuzzjoni f'kompartimenti ta' inkubazzjoni.

▼M8

37. Il-filamenti tal-bajd, li jżommu l-bajd riprodott flimkien, għandhom jitneħħew. Il-bajd fertilizzat (sa 20) jinġabar minn kull par tat-tnissil (par 1 għal kull replika), jinġabar skont it-trattament, u jitqassam b'mod sistematiku f'kompartimenti xierqa ta' inkubazzjoni (Appendiċi 6, 7). Bl-użu ta' mikroskopju ta' kwalità tajba, wieħed ikun jsita' jara l-indikaturi ta' fertilizzazzjoni/żvilupp bikrin bħat-tlugħ tal-membrana tal-fertilizzazzjoni (korjon), id-diviżjoni kurrenti taċ-ċelloli, jew il-formazzjoni tal-blastula. Il-kompartimenti tal-inkubaturi jistgħu jitqiegħdu f'"akkwarji inkubaturi" separati stabbiliti għal kull trattament (f'liema każ il-parametri tal-kwalità tal-ilma u l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test iridu jitkejlu fihom), jew fl-akkwarju replika li fih ikun hemm il-larva mfaqqsa (*eż.* elewteroembrijun). Jekk ikun hemm bżonn tat-tieni jum tal-ġbir (Jum 23 tat-Test), il-bajd kollu minn dawn iż-żewġ ġranet għandu jinġabar flimkien u mbagħad jitqassam b'mod sistematiku f'kull waħda mir-repliki tat-trattament.

Trobbija tal-bajd għat-tifqis

38. Il-bajd fertilizzat jitheżżeż il-ħin kollu *eż.*, fi ħdan l-inkubatur tal-bajd bi bżieżaq tal-arja jew bit-tbandil vertikali tal-inkubatur tal-bajd. Il-mortalitajiet tal-bajd fertilizzat (embrijuni) jiġu verifikati u reġistrati ta' kuljum. Bajd mejjet jitneħħa mill-inkubaturi (Appendiċi 9). Fil-jum 7 wara l-fertilizzazzjoni (dpf), it-theżżiż jitwaqqaf jew jitnaqqas biex il-bajd fertilizzat ikun jista' joqgħod fil-qiegħ tal-inkubatur. Dan jippromwovi t-tifqis, tipikament tul il-jum jew il-jumejn segwenti. Għal kull trattament u kontroll, l-imfaqqsa (larva żgħar; elewteroembrijun) jingħaddu (fuq il-bażi ta' repliki miġbura flimkien). Il-bajd fertilizzat li ma jkunx għadu faqqas sad-doppju tal-jum medjan tat-tifqis fil-kontroll (tipikament dpf 16 jew 18) jitqies mhux vijabbli u jintrema.

39. Tnax-il imfaqqas jiġu trasferiti f'kull tank replika. L-imfaqqsa mill-kompartimenti ta' inkubazzjoni jinġabru flimkien u jitqassmu b'mod sistematiku f'tankijiet replika (Appendiċi 7). Dan jista' jsir bl-għażla aleatorja ta' mfaqqas mill-grupp tat-trattament u biż-żieda sekwenzjali ta' mfaqqas fi grupp indiskriminat f'akwarju replika. Kull wieħed mit-tankijiet għandu jkun fih numru ugwali (n=12) tal-larva mfaqqsa (massimu ta' 20 larva kull wieħed). Jekk ma jkunx hemm biżżejjed imfaqqsa biex jimtlew ir-repliki kollha tat-trattament, hu rakkomandat li jiġi żgurat l-akbar ammont possibbli ta' repliki bi 12-il imfaqqas. L-imfaqqsa jistgħu jiġu mmaniġġjati b'mod sikur b'pipetti tal-ħġieġ b'toqba wiesgħa. Kwalunkwe mfaqqas addizzjonali jinqatel bl-ewtanażja bl-anestetiku. Matul il-ftit ġimgħat ta' qabel l-istabbiliment tal-pari tat-tnissil, għandu jiġi rreġistrat il-jum li fih jiġi osservat l-ewwel avveniment ta' riproduzzjoni f'kull replika.

Stabbiliment tal-pari tat-tnissil

Qtugħ tal-pinen u determinazzjoni tas-sess ġenotipiku

40. Id-determinazzjoni tas-sess ġenotipiku permezz tal-qatgħat tal-pinen issir fid-9-10 wpf (jiġifieri l-Ġimgħa 12-13 tat-Test għall-ġenerazzjoni F1). Il-ħut kollu fi ħdan tank jiġi anestetizzat (bl-użu ta' metodi approvati, eż. IACUC) u jittieħed kampjun tat-tessut żgħir mit-tarf dorsali jew ventrali tal-pinna tad-denb ta' kull ħuta biex jiġi determinat is-sess ġenotipiku tal-individwu (29). Il-ħuta minn replika tista' titqiegħed f'gaġeġ żgħar, jekk possibbli waħda f'kull gaġġa, fit-tank replika. Inkella, żewġ ħutiet jistgħu jinżammu f'kull gaġġa jekk ikunu distingwibbli minn xulxin. Metodu minnhom hu li tinqata' b'mod differenzjali l-pinna tad-denb (*eż.* tarf dorsali vs ventrali) meta jittieħed il-kampjun tat-tessut.

▼M8

41. Is-sess ġenotipiku tal-medaka jiġi determinat b'ġene identifikat u sekwenzjat (*dmy*) li jinsab fuq il-kromożoma Y. Il-preżenza tad-*dmy* tindika individwu XY indipendentement mill-fenotip, filwaqt li n-nuqqas ta' *dmy* jindika individwu XX indipendentement mill-fenotip (30); (31). Jiġi estratt l-aċidu nuklejku deossiribożi (DNA) minn kull qatgħa ta' pinna u l-preżenza jew l-assenza ta' *dmy* tkun tista' tiġi determinata b'metodi ta' reazzjoni tal-katina tal-polimeraži (PCR) (irreferi għall-Appendiċi 9 fil-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, jew għall-Appendiċijiet 3 u 4 f'(29).

Stabbiliment tal-pari tat-tnissil

42. L-informazzjoni dwar is-sess ġenotipiku tintuża biex jiġu stabbiliti l-pari tat-tnissil XX-XY indipendentement mill-fenotip estern li jista' jiġi alterat bl-esponiment għal sustanza kimika tat-test. Fil-jum ta' wara dak li fih jiġi determinat is-sess ġenotipiku ta' kull ħuta, jintgħażlu b'mod aleatorju żewġ ħutiet XX u żewġ ħutiet XY minn kull replika u jiġu stabbiliti żewġ pari tat-tnissil XX-XY. Jekk replika ma jkollhiex żewġ ħutiet XX jew żewġ ħutiet XY, għandu jinkiseb il-ħut xieraq minn repliki oħra fi ħdan it-trattament. Il-prijorità hi li jkun hemm in-numru rakkomandat ta' pari tat-tnissil repliki (12) f'kull trattament u fil-kontrolli (24). Ħut b'anormalitajiet ovvji (problemi fil-bużżieqa tal-għawm, deformitajiet fis-sinsla, varjazzjonijiet estremi fid-daqs, eċċ.) ikun prekluż meta jiġu stabbiliti l-pari tat-tnissil. Matul il-faži riproduttiva għall-F1, kull tank replika għandu jkun fih par tat-tnissil wieħed biss.

Kampjunar ta' subadulti u valutazzjoni tal-punti ta' tmiem

Kampjunar ta' ħut f'pari mhux tat-tgħammir

43. Wara l-issettjar tal-pari tat-tnissil, il-ħut mhux magħżul għal tgħammir ulterjuri jinqatel bl-ewtanażja għall-kejl tal-punti ta' tmiem subadulti fil-Ġimgħa 12-13 tat-Test (F1). Hu estremament importanti li l-ħut jiġi mmaniġġjat b'tali mod li s-sess ġenotipiku determinat għall-għażla tal-pari tat-tgħammir ikun għadu jista' jiġi traċċat għalħuta individwali. Id-*data* kollha miġbura tiġi analizzata fil-kuntest tas-sess ġenotipiku tal-ħut speċifiku. Kull ħuta tintuża għal varjetà ta' kejlijiet tal-punti ta' tmiem inklużi: determinazzjoni tar-rati ta' sopravivenza ta' ħut li għadu qed jikber/subadult (Ġimgħat 7-12/13 tat-Test (F1), tkabbir fit-tul (tul standard jista' jitkejjel jekk il-pinna tad-denb tkun tqassret minħabba l-kampjunar għall-analiži tas-sess ġenetiku. It-tul totali jista' jitkejjel jekk jittieħed kampjun ta' parti biss mill-pina tad-denb, dorsali jew ventrali, għad-*dmy*) u l-massa tal-ġisem (jiġifieri l-piż imxarrab, ixxottat bit-taptip) l-mRNA tal-*vtg* tal-fwied (jew il-VRG) u l-papilli tal-pinna anali (ara t-Tabelli 1 u 2). Kun af li l-piżijiet u t-tul tal-pari tat-tnissil huma meħtieġa wkoll għall-kalkolu tat-tkabbir medju fi grupp tat-trattament.

Kampjunar tat-tessuti u kejl tal-vitelloġenina

44. Il-fwied jinqata', u għandu jinħażen f'≤ –70 °C sal-kejl tal-mRNA tal-*vtg* (jew il-VTG). Id-denb tal-ħut, inkluża l-pinna anali, jiġi preservat f'fissattiv xieraq (eż. ta' Davidson) jew jittiħidlu ritratt biex il-papilli tal-pinna anali jkunu jistgħu jingħaddu f'data aktar tard. Jekk dan ikun mixtieq, jista' jittieħed kampjun ta' tessuti oħra (jiġifieri gonad) u dawn jistgħu jiġu preservati f'dan il-ħin). Il-konċentrazzjoni tal-VTG tal-fwied għandha tiġi kwantifikata b'teknika ELISA omologa (ara l-proċeduri rakkomandati għall-medaka fl-Appendiċi 6 fil-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness). Inkella, il-metodi għall-kwantifikazzjoni tal-mRNA tal-vtg, jiġifieri l-estrazzjoni tal-mRNA tal-ġene *vtg I* minn kampjun tal-fwied u kwantifikazzjoni tan-numru ta' kopji tal-ġene *vtg I* (għal kull ng tal-mRNA totali) bil-PCR kwantitattiva, ġew stabbilti mill-EPA tal-Istati Uniti (29). Minflok ma jiġi determinat in-numru ta' kopji tal-ġene

▼M8

vtg fil-gruppi tal-kontroll u tat-trattament, metodu aktar effiċjenti fir-riżorsi u anqas teknikament diffiċili hu li jiġi determinat it-tibdil (ta' drabi) relattiv fl-espressjoni tal-vtg I mill-gruppi tal-kontroll u tat-trattament.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

45. F'ċirkustanzi normali, medaka rġiel sesswalment maturi biss ikollhom papilli, li jiżviluppaw fuq il-pjastri konġunti ta' ċerti raj tal-pinna anali bħala karatteristika sesswali sekondarja, filwaqt li jipprovdu bijomarkatur potenzjali għal effetti ta' intereferenza endokrinali. Il-metodu tal-għadd tal-papilli tal-pinen anali (in-numru ta' pjastri konġunti bil-papilli) jingħata fl-Appendiċi 8. Barra minn hekk, in-numru ta' papilli tal-pinen anali għal kull individwu jintuża biex dak l-individwu jiġi karatterizzat bħala raġel jew mara esternament fenotipiċi għall-fini tal-kalkolu ta' proporzjon sempliċi tas-sessi għal kull replika. Medaka bi kwalunkwe numru akbar minn 0 tiġi definita bħala raġel; medaka b'ebda papilla tal-pinna anali tiġi definita bħala mara.

Valutazzjoni tal-fekondità u tal-fertilità

46. Il-fekondità u l-fertilità jiġu vvalutati fil-Ġimgħat 1 sa 3 tat-Test fil-ġenerazzjoni F0 u l-Ġimgħat 15 sa 17 tat-Test fil-ġenerazzjoni F1. Il-bajd jinġabar ta' kuljum minn kull par tat-tgħammir għal 21 jum konsekuttiv. Il-bajd jitneħħa bil-galbu min-nisa maqbuda u/jew jinġibdu b'sifun mill-qiegħ tal-akkwarju kull għodwa. Kemm il-fekondità kif ukoll il-fertilità jiġu reġistrati ta' kuljum għal kull par replika tat-tgħammir. Il-fekondità hi definita bħala n-numru ta' bajd riprodotti, u l-fertilità hi funzjonalment definita bħala n-numru ta' bajd fertilizzat u vijabbli fil-ħin tal-għadd. L-għadd għadu jsir mill-aktar fis possibbli wara l-ġbir tal-bajd.

47. Il-fekondità tar-repliki tiġi reġistrata ta' kuljum bħala n-numru ta' bajd għal kull par tat-tgħammir li jiġi analizzat bil-proċeduri statistiċi rakkomandati bl-użu tal-medji tar-repliki. Il-fertilità tar-repliki hi s-somma tan-numru ta' bajd fertili prodott minn par tat-tgħammir diviża bis-somma tan-numru ta' bajd prodott minn dak il-par. Statistikament il-fertilità tiġi analizzata bħala proporzjon għal kull replika. Il-kapaċità ta' tifqis tar-repliki hi n-numru ta' mfaqqsa diviż bin-numru ta' embrijuni mgħobbija (tipikament 20). Statistikament il-kapaċità ta' tifqis tiġi analizzata bħala proporzjon għal kull replika.

Kampjunar ta' adulti u valutazzjoni tal-punti ta' tmiem

Kampjunar ta' ħut f'pari tat-tgħammir

48. Wara l-Ġimgħa 17 tat-Test (jiġifieri wara li tibda b'suċċess il-ġenerazzjoni F2), l-adulti F1 jinqatlu bl-ewtanażja u jiġu vvalutati diversi punti ta' tmiem (ara t-Tabelli 1 u 2). Tittieħed immaġni tal-pinna anali għall-valutazzjoni tal-papilli tal-pinen anali (ara l-Appendiċi 8), u/jew id-denb, eżatt wara t-toqba, jitneħħa u jiġi ffissat għall-għadd tal-papilli aktar tard. Jista' jittieħed kampjun ta' biċċa mill-pinna tad-denb u din tista' tiġi arkivjata f'dan il-waqt għall-verifika tas-sess ġenetiku (*dmy*) jekk din tkun mixtieqa. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jittieħed kampjun tat-tessut biex tiġi ripetuta l-analiżi tad-*dmy* għall-verifika tas-sess ġenetiku ta' ħuta speċifika. Il-kavità tal-ġisem tinfetaħ biex tkun tista' ssir perfużjoni b'fissattivi xierqa (eż. ta' Davidson) qabel it-tgħaddis tal-ġisem sħiħ fil-fissattiv. Madankollu, jekk jitwettaq pass xieraq ta' permeabilizzazzjoni qabel il-fissazzjoni, il-kavità tal-ġisem ma jkollhiex bżonn tinfetaħ.

▼**M8**

Istopatoloġija

49. Kull ħuta tiġi evalwata istoloġikament għall-patoloġija fit-tessut gonadali (30); (29). Kif imsemmi fil-paragrafu 33, punti ta' tmiem mekkanistiċi oħra evalwati f'dan l-assaġġ (jiġifieri l-VTG, l-SSCs u ċerti effetti tal-istopatoloġija gonadali) jistgħu jkunu influwenzati minn tossiċitajiet sistemiċi jew oħrajn. Konsegwentement, l-istopatoloġija tal-fwied u tal-kliewi tista' tiġi vvalutata wkoll f'dettall biex jinftiehem aħjar kwalunkwe rispons f'punti ta' tmiem mekkanistiċi. Madankollu, jekk ma jsirux dawn l-evalwazzjonijiet dettaljati, anormalitajiet grossi osservati b'mod inċidentali matul l-evalwazzjoni istopatoloġika xorta waħda għandhom jiġu nnotati u rapportati. "Il-qari 'l isfel" mill-ogħla grupp tat-trattament (meta mqabbel mal-kontroll) għal trattament b'ebda effett jista' jiġi kkunsidrat, iżda hu rakkomandat li tiġi kkonsultata l-gwida dwar l-istopatoloġija (29). Tipikament, il-kampjuni kollha jiġu proċessati/sezzjonati, u wara dan jinqraw mill-patologu. Jekk jintuża approċċ ta' "qari 'l isfel", hu nnotat li l-proċedura Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) tuża l-aspettattiva li hekk kif jiżdiedu l-livelli tad-doża, l-impatt bijoloġiku (il-patoloġija) jiżdied ukoll. Għaldaqstant, wieħed jitlef is-saħħa jekk iħares biss lejn doża għolja waħda mingħajr ebda doża intermedja. Jekk l-analiżi statistika ma tkunx neċessarja biex jiġi determinat li d-doża ma għandha ebda effett, dan l-approċċ jista' jkun aċċettabbli. Il-fenotip tal-gonadi jinkiseb b'din l-evalwazzjoni wkoll

Osservazzjonijiet oħra

50. Il-MEOGRT jipprovdi *data* li tista' tintuża (eż. f'approċċ tal-piż ta' evidenza) biex jiġu evalwati fl-istess ħin tal-anqas żewġ tipi ġenerali ta' perkorsi tal-eżitu avvers (AOPs) li jintemmu f'indeboliment riproduttiv: (a) perkorsi medjati bl-endokrina li jinvolvu interferenza tal-assi endokrinali ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG); u, (b) perkorsi li jikkawżaw tnaqqis fis-sopravivenza, fit-tkabbir (tul u piż), u fir-riproduzzjoni permezz ta' tossiċità medjata mhux permezz tal-endokrina. Il-punti ta' tmiem tipikament jitkejlu f'testijiet tat-tossiċità kronika bħat-test taċ-ċiklu tal-ħajja sħiħ u t-test tal-istadju bikri tal-ħajja wkoll huma inklużi f'dan it-test u jistgħu jintużaw biex jiġu evalwati l-perikli miġjuba kemm minn modalitajiet ta' azzjoni tossiċi medjati mhux mill-endokrina kif ukoll minn perkorsi tat-tossiċità medjati mill-endokrina. Matul it-test, l-osservazzjonijiet tal-imġiba għandhom isiru ta' kuljum, u kwalunkwe mġiba mhux tas-soltu għandha tiġi notata. Barra minn hekk, kwalunkwe mortalità għandha tiġi reġistrata u s-sopravivenza sal-qtil tal-ħut (ġimgħa 6/7 tat-test), is-sopravivenza wara l-qtil sal-kampjunar subadult (f'9-10 wpf), u s-sopravivenza mit-tqegħid f'pari sal-kampjunar tal-ħut adult għandhom jiġu kkalkolati.

Tabella 1

Harsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-MEOGRT (*)

Stadju tal-ħajja	Punt ta' tmiem	Ġenerazzjoni
Embrijun (2 wpf)	Tifqis (% u żmien sat-tifqis)	F1, F2
Ħut li għadu qed jikber (4 wpf)	Sopravivenza	F1
Subadult (9 jew 10 wpf)	Sopravivenza	F1
	Tkabbir (tul u piż)	

▼M8

Stadju tal-ħajja	Punt ta’ tmiem	Ġenerazzjoni
	Vitelloġenina (mRNA jew proteina)	
	Karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinna anali)	
	Proporzjon tas-sess estern	
	Żmien għall-1el riproduzzjoni	
Adult (12-14-il wpf)	Riproduzzjoni (fekondità u fertilità)	F0, F1
Adult (15 wpf)	Sopravivenza	F1
	Tkabbir (tul u piż)	
	Karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinna anali)	
	Istopatoloġija (gonad, fwied, kilwa)	

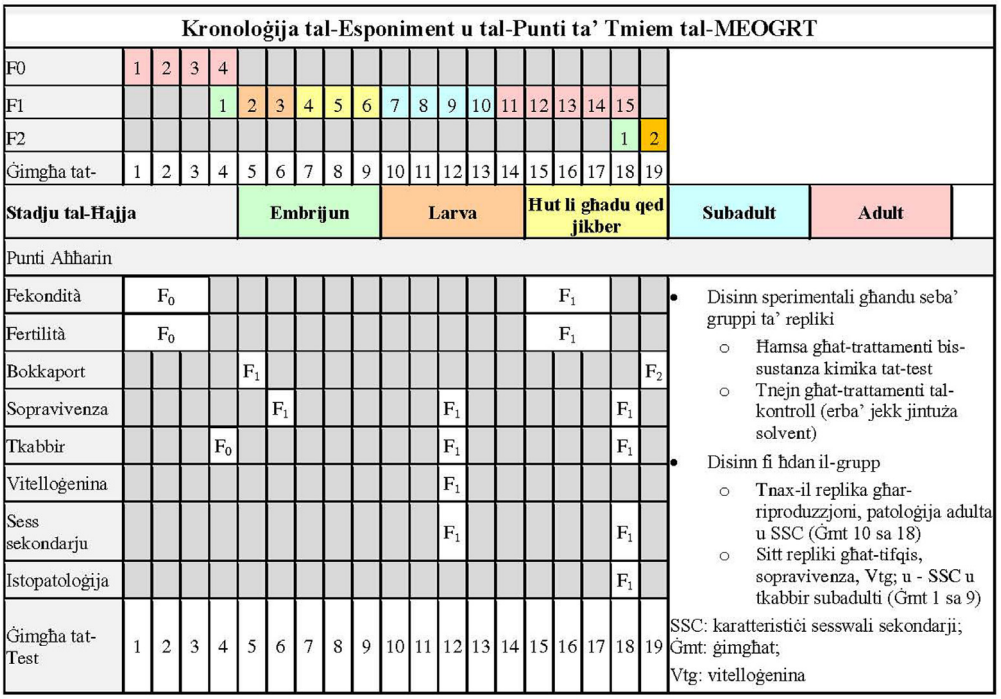
(*) Dawn il-punti ta’ tmiem għandhom jiġu analizzati statistikament

KRONOLOĠIJA

51. Kronoloġija għall-MEOGRT murija fit-Tabella 2 turi t-test. L-MEOGRT tinkludi 4 ġimgħat esponiment għal adulti F0 u 15-il ġimgħa esponiment għall-ġenerazzjoni F1, u perjodu ta’ esponiment għat-tieni ġenerazzjoni (F2), sat-tifqis (2 wpf). L-attività matul l-MEOGRT hi spjegata fl-Appendiċi 9.

Tabella 2

Kronoloġiji tal-punti ta’ tmiem tal-esponiemnt u tal-kejl għall-MEOGRT



▼M8

DATA U RAPPORTAR

Analiżi statistika

52. Peress li s-sess ġenotipiku jiġi determinat għall-ħut kollu tat-test, id-*data* għandha tiġi analizzata għal kull sess ġenotipiku b'mod separat (jiġifieri rġiel XY u nisa XX). Nuqqas milli jsir hekk inaqqas bil-bosta s-saħħa statistika ta' kwalunkwe analiżi. Idealment, l-analiżijiet statistiċi tad-*data* għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument tal-OECD dwar l-Approċċi Kurrenti fl-Analiżi Statistika tad-*Data* dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (32). L-Appendiċi 10 jipprovdi gwida ulterjuri għall-Analiżi Statistika.

53. Id-disinn tat-test u l-għażla tat-testijiet statistiċi għandhom jippermettu saħħa adegwata li jiġu individwati tibdiliet ta' importanza bijoloġika f'punti ta' tmiem fejn trid tiġi rapportata NOEC (32). Ir-rapportar tal-konċentrazzjonijiet tal-effett u l-parametri rilevanti jista' jiddependi fuq il-qafas regolatorju. Għandu jkun identifikat it-tibdil perċentwali f'kull punt ta' tmiem li jkun importanti għad-detezzjoni jew għall-istima. Id-disinn sperimentali għandu jitfassal biex jippermetti dan. Mhuwiex probabbli li l-istess tibdil perċentwali japplika għall-punti ta' tmiem kollha, lanqas ma hu probabbli li jkun jista' jitfassal esperiment fattibbli li jissodisfa dawn il-kriterji għall-punti ta' tmiem kollha, u għalhekk hu importanti li wieħed jiffoka fuq il-punti ta' tmiem li huma importanti għall-esperiment rispettiv biex l-esperiment jitfassal kif xieraq. Flow diagram statistiku u l-gwida huma disponibbli fl-Appendiċi 10 biex iservu ta' għajnuna fit-trattament tad-*data* u fl-għażla tal-aktar test statistiku jew mudell xieraq li għandu jintuża. Jistgħu jintużaw approċċi statistiċi oħra, dment li jkunu xjentifikament ġustifikati.

54. Se jkun neċessarju li l-varjazzjonijiet jiġu analizzati f'kull sett ta' repliki bl-użu ta' analiżi tal-varjanza jew proċeduri b'tabella ta' kontinġenza u li jintużaw metodi ta' analiżi statistika xierqa u suffiċjenti abbażi ta' din l-analiżi. Biex isir tqabbil multiplu bejn ir-riżultati fil-konċentrazzjonijiet individwali u dawk għall-kontrolli, il-proċedura ta' tendenza rigressiva (eż. it-test ta' Jonckheere-Terpstra) hi rakkomandata għal risponsi kontinwi. Meta d-*data* ma tkunx konsistenti ma' konċentrazzjoni-rispons monotoni, għandu jintuża t-test ta' Dunnett jew it-test ta' Dunn (wara trasformazzjoni adegwata tad-*data*, jekk ikun hemm bżonn).

55. Għall-fekondità, l-għadd tal-bajd isir kuljum, iżda jista' jiġi analizzat bħala l-għadd totali tal-bajd jew bħala kejl ripetut. L-Appendiċi 10 jipprovdi dettalji dwar kif jiġi analizzat dan il-punt ta' tmiem. Għad-*data* dwar l-istopatoloġija li tkun fil-forma ta' punteġġi tas-severità, ġie żviluppat test statistiku ġdid, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Għandu jiġi rapportat kwalunkwe punt ta' tmiem osservat fi trattamenti kimiċi li jkunu differenti b'mod sinifikanti minn kontrolli xierqa.

Kunsiderazzjonijiet għall-analiżi tad-*data*

Użu ta' livelli tat-trattament f'riskju

57. Jiġu kkunsidrati bosta fatturi meta jiġi stabbilit jekk replika jew trattament sħiħ jurux tossiċità ċara u għandhomx jitneħħew mill-analiżi. Tossiċità ċara hi definita bħala > 4 mortalitajiet fi kwalunkwe replika bejn it-3 wpf u d-9 wpf li ma jkunux jistgħu jiġu spjegati minn żball tekniku. Sinjali oħra ta' tossiċità ċara jinkludu emorraġija, imġiba anormali, xejriet tal-għawn anormali, anoressija u kwalunkwe sinjal kliniku ieħor ta' mard. Għal sinjali subletali ta' tossiċità, jista' jkun hemm bżonn ta' evalwazzjonijiet kwalitattivi, u dejjem għandha ssir referenza għall-grupp ta' kontroll bl-ilma ta'

▼M8

dilwizzjoni (ilma nadif biss). Jekk it-tossiċità ċara tkun evidenti fl-ogħla trattament(i), hu rakkomandat li dawk it-trattament jiġu ċċensurati mill-analiżi.

Kontrolli b'solvent

58. L-użu ta' solvent għandu jiġi kkunsidrat biss bħala l-aħħar rikors, wara li jkunu ġew ikkunsidrati l-għażliet l-oħra kollha ta' twassil. Jekk jintuża solvent, f'dak il-każ għandu jsir fl-istess ħin kontroll b'ilma ta' dilwizzjoni. Fi tmiem it-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent. Dan isir permezz ta' paragun statistiku tal-grupp ta' kontroll b'solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. L-aktar punti ta' tmiem relevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analiżi huma d-determinanti tat-tkabbir (piż), peress li dawn jistgħu jkunu affettwati permezz ta' tossiċitajiet ġeneralizzati. Jekk jinstabu differenzi statistikament sinifikanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-gruppi tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni u tal-kontroll b'solvent, għandu jintuża l-aħjar ġudizzju professjonali biex jiġi determinat jekk il-validità tat-test hix f'riskju. Jekk iż-żewġ kontrolli jvarjaw, it-trattamenti esposti għas-sustanza kimika għandhom jitqabblu mal-kontroll b'solvent sakemm ma jkunx magħruf li jkun preferut it-tqabbil mal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn iż-żewġ gruppi tal-kontroll, hu rakkomandat li t-trattamenti esposti għas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mar-raggruppati (gurppi tal-kontroll b'solvent u bl-ilma ta' dilwizzjoni), sakemm ma jkunx magħruf li t-tqabbil mal-grupp tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni jew tal-kontroll b'solvent biss hu preferut.

Rapport tat-test

59. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test: l-għamla fiżika u, fejn relevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;

— *Data* dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impuritajiet bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test:

— L-isem xjentifiku, ir-razza jekk disponibbli, is-sors u l-metodu tal-ġbir tal-bajd fertilizzat, u l-immaniġġjar sussegwenti.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— Il-fotoperjodu/i;

— Id-disinn tat-test (eż. id-daqs tal-kompartiment, il-materjal u l-volum tal-ilma, in-numru ta' kompartimenti u ta' repliki tat-test, in-numru ta' mfaqqsa għal kull replika);

▼**M8**

— Il-metodu ta' tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-frekwenza tat-tiġdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);

— Il-metodu li jintuża għad-dożaġġ tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompi, sistemi ta' dilwizzjoni);

— L-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu li permezz tiegħu nkisbu u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;

— Il-karatteristiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli tal-kloru residwu (jekk jitkejjel), il-karbonju organiku totali (jekk jitkejjel), is-solidi sospiżi (jekk jitkejlu), is-salinità tal-medium tat-test (jekk titkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir;

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom;

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, it-temperatura (ta' kuljum) u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;

— Informazzjoni dettaljata dwar it-tagħlif (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza).

Ir-riżultati:

— Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji dwar il-validazzjoni ġenerali;

— Id-*data* għall-kontroll (flimkien mal-kontroll b'solvent meta jintuża) u għall-gruppi tat-trattament kif ġej, it-tifqis (il-kapaċità ta' tifqis u ż-żmien sat-tifqis) għall-F1 u għall-F2, is-sopravivenza wara t-tifqis għall-F1, it-tkabbir (tul u piż tal-ġisem) għall-F1, is-sess ġenotipiku u d-differenzazzjoni sesswali (eż. karatteristiċi sesswali sekondarji fuq il-bażi tal-papilli tal-pinen anali u istoloġija gonadali) għall-F1, is-sess fenotipiku għall-F1, il-karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinen anali) għall-mRNA tal-*vtg* tal-F1 (jew il-proteina tal-VTG) għall-F1, valutazzjoni tal-istopatoloġija (gonad, fwied u kilwa) għall-F1 u r-riproduzzjoni (fekondità u fertilità) għall-F0, F1; (ara t-Tabelli 1 u 2).

— L-approċċ għall-analiżi statistika (analiżi ta' rigressjoni jew analiżi tal-varjanza) u t-trattament tad-*data* (it-testijiet statistiċi u l-mudelli użati);

— Il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) għal kull rispons ivvalutat;

— Il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) għal kull rispons ivvalutat (f'p = 0,05); L-EC_x għal kull rispons ivvalutat, jekk applikabbli, u l-intervalli ta' kunfidenza (eż. 90 % jew 95 %) u graff tal-mudell imdaħħal għall-kalkolu tagħha, il-pendil tal-kurva konċentrazzjoni rispons, il-formula tal-mudell ta' rigressjoni, il-parametri stmati tal-mudell u l-erruri standard tagħhom.

— Kwalunkwe devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ttestjar u devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni, u kunsiderazzjonijiet tal-konsegwenzi potenzjali fuq l-eżitu tat-test.

▼**M8**

60. Għar-riżultati tal-kejlijiet tal-punti ta' tmiem, għandhom jiġu ppreżentati l-valuri medji u d-devjazzjonijiet standard tagħhom (kemm fuq bażi ta' repliki kif ukoll fuq bażi ta' konċentrazzjoni, jekk possibbli).

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K u Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T u Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T u Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H u Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71-80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H i Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H u Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M u Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M u Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T u Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes)*. Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Disponibbli fuq: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P u McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

▼**M8**

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ u Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE u Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ u Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K u Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K u Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Il-Kapitolu C.15 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Fuq Terminu Qasir fuq l-Istadji tal-Embrijuni u tal-Qixx fil-Borża.

(22) Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Ħut Fuq 21 Jum: Skrinjar fuq Terminu Qasir għal Attività Estroġenika u Androġenika, u Inibizzjoni tal-Aromataża.

(23) Il-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut.

(24) Il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness: Assaġġ dwar ir-Riproduzzjoni Fuq Terminu Qasir tal-Ħut.

(25) Il-Kapitolu C.47 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità fl-Istadju tal-Ħajja Bikrija.

(26) Il-Kapitolu C.49 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta fuq l-Embrijuni tal-Ħut (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L u Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M u Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M u Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245-251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S u Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (l-annessi għal din il-pubblikazzjoni jeżistu bħala dokument separat), OECD Publishing, Pariġi.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN u Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼**M8**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku

Fekondità = numru ta' bajd;

Fertilità = numru ta' bajd vijabbli/fekondità;

Tul sal-furketta (FL): jirreferi għat-tul mill-ponta tal-geddum sal-aħħar tax-xewk tal-pinen f'nofs id-denb u jintuża f'ħut fejn hu diffiċli li wieħed jgħid fejn tispiċċa l-kolonna vertebrali (www.fishbase.org)

Kapaċità ta' tifqis = imfaqqsa/numru ta' embrijuni mgħobbija f'inkubatur

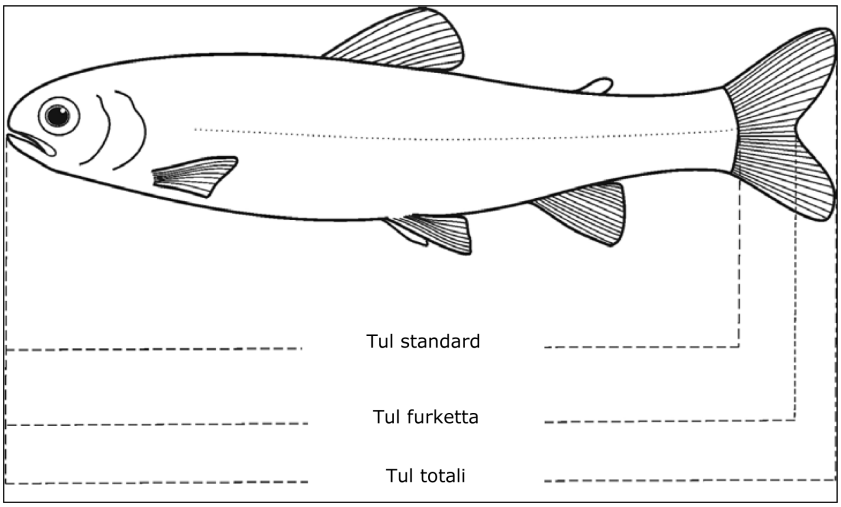
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

Tul standard (SL): jirreferi għat-tul ta' ħuta mkejjel mill-ponta tal-geddum sat-tarf ta' wara tal-aħħar vertebra jew sat-tarf ta' wara tal-porzjon midlaterali tal-hypural plate. Fi kliem sempliċi, dan il-kejl jeskludi t-tul tad-denb. (www.fishbase.org)

Tul totali (TL) jirreferi għat-tul mill-ponta tal-geddum sal-ponta tal-lobu itwal tad-denb, ġeneralment imkejjel bil-lobi kkumpressati tul il-linja tan-nofs. Dan hu kejl ta' linja dritta, li ma jitkejjilx fuq il-kurva tal-ġisem (www.fishbase.org)

Figura 1

Deskrizzjoni tat-tulijiet differenti użati



ECx: (Konċentrazzjoni effettiva għal effett ta' x %) hi l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organiżmi tat-test f'perjodu ta' esponiment partikolari meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC50 hi konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' esponiment definit.

Test bi fluss kontinwu ta' soluzzjonijiet tat-test fis-sistema tat-test matul id-durata tal-esponiment.

Assi HPG: assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali.

▼**M8**

IUPAC: Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata.

Rata ta' tagħbija: Il-piż imxarrab tal-ħut skont il-volum ta' ilma.

Konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) hi l-anqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test li fiha tiġi osservata s-sustanza kimika biex ikollha effett statistikament sinifikanti (f'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha li jkunu ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż daqs jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC). L-Appendiċijiet 5 u 6 jipprovdu gwida.

Konċentrazzjoni Letali Medjana (LC50): hi l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li hi stmata li tkun letali għal 50 % tal-organiżmi tat-test fid-durata tat-test.

Konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) hi l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC, li meta mqabbla mal-kontroll, ma jkollha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$), f'perjodu ta' esponiment ddikjarat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Densità tal-istokkjar: L-għadd ta' ħut għal kull volum ta' ilma.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

VTG: Vitelloġenina hi prekursur tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment iseħħ f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

WPF: Ġimgħat ta' wara l-fertilizzazzjoni

▼**M8**

Appendiċi 2

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjoni ta' limitu
Materja partikulata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromu	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Ħadid	1 µg/l
Ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

▼**M8**

Appendiċi 3

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST GĦALL-MEOGRT

1. Speċijiet rakkomandati	Medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*)
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu
3. Temperatura tal-ilma	It-temperatura nominali tat-test hi ta' 25°C. It-temperatura medja tul it-test kollu f'kull tank hi ta' 24-26 °C.
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa' u ~150 lumen/m^2) (~150 lux).
5. Fotoperjodu	16-il siegħa dawl, tmien sigħat dlam
6. Rata ta' tagħbija	F0: żewġ adulti/replika; F1: imnedija b'massimu ta' 20 bajda (embrijun)/replika, imnaqqsa għal 12-il embrijun/replika fit-tifqis u mbagħad 2 adulti (pari tat-tgħammir XX-XY) fid-9-10 wpf għall-fażi riproduttiva
7. Volum minimu utilizzabbli tal-kompartiment tat-test	1,8 l (eż., daqs tal-kompartiment tat-test: 18x9x15-il cm)
8. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Minimu ta' ħames drabi ta' tiġdid tal-volum/jum sa 16-il darba ta' tiġdid tal-volum/jum (jew fluss ta' 20 ml/min)
9. Età tal-organiżmi tat-test fil-bidu	F0: > 12-il wpf iżda hu rakkomandat li ma jinqabżux is-16-il wpf
10. In-numru ta' organiżmi għal kull replika	F0: 2 ħutiet (par ta' raġel u mara); F1: massimu ta' 20 ħuta (bajd)/replika (prodotti mill-pari tat-tgħammir tal-F0 u tal-F1).
11. In-numru ta' trattamenti	Ħames trattamenti bis-sustanza kimika tat-test flimkien mal-kontroll(i) xieraq/xierqa
12. In-numru ta' repliki għal kull trattament	Minimu ta' sitt repliki għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u minimu ta' 12-il replika għall-kontroll, u għall-kontroll b'solvent, jekk użati (in-numru ta' repliki jirdoppja fi ħdan il-fażi tar-riproduzzjoni fil-F1)
13. In-numru ta' organiżmi għal kull test	Minimu ta' 84 ħuta fl-F0 u 504 fl-F1. (Jekk jintuża kontroll b'solvent, 108 ħutiet fl-F0 u 648 ħuta fl-F1). L-unità li tingħadd hi l-postelewteroembrijun.
14. Reġim tal-għalf	Il-ħut jintema' l-gambli tal-ilma mielaħ, *Artemia* spp., (nauplii li jkollu 24 siegħa) *ad libitum*, supplimentat b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn (Skeda ta' tagħlif bħala eżempju biex jiġu żgurati tkabbir u żvilupp adegwati b'sostenn tar-riproduzzjoni robusta tista' tinstab fl-Appendiċi 5).

▼**M8**

15. Ossiġenazzjoni	Ebda sakemm l-ossiġenu dissolt ma joqrobx lejn < 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja
16. Ilma ta' dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif.
17. Perjodu ta' esponiment	Primarjament 19-il ġimgħa (mill-F0 sat-tifqis tal-F2)
18. Punti ta' tmiem bijoloġiċi (primarji)	Kapaċità ta' tifqis (F1 u F2); sopravivenza (F1, mit-tifqis sar-4 wpf (tmiem il-larva/bidu tal-faża tal-ħut li għadu qed jikber), mir-4 sad-9 (jew l-10) wpf (bidu tal-faża tal-ħut li għadu qed jikber sa subadult) u minn 9 sa 15-il wpf (subadult sa terminazzjoni tal-adult)); tkabbir (F1, tul u piż f'9 u 15-il wpf); karatteristiċi sesswali sekondarji (F1, papilli tal-pinen anali fid-9 u fil-15-il wpf); vitelloġenina (F1, mRNA tal-*vtg* jew proteina tal-VTG fil-15-il wpf); sess fenotipiku (F1, permezz tal-istoloġija gonadali fil-15-il wpf); riproduzzjoni (F0 u F1, il-fekondità u l-fertilità għal 21 jum); ħin sar-riproduzzjoni (F1); u istopatoloġija (F1, gonad, fwied u kilwa fil-15-il wpf)
19. Il-kriterji ta' validità tat-test	Ossiġenu dissolt ta' ≥ 60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja; temperatura medja tal-ilma ta' 24-26°C matul it-test; riproduzzjoni b'suċċess ta' ≥ 65 % tan-nisa fil-kontroll(i); fekondità medja ta' kuljum ta' ≥ 20 bajd fil-kontroll(i); kapaċità ta' tifqis ta' ≥ 80 % (medja) fil-kontrolli (f'kull waħda mill-F1 u mill-F2); sopravivenza wara t-tifqis sat-3 wpf ta' ≥ 80 % (medja) u minn 3 wpf sat-terminazzjoni għall-ġenerazzjoni ta' ≥ 90 % (medja) fil-kontrolli (F1), il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni għandhom jinżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla.

▼**M8**

Appendiċi 4

GWIDA DWAR IL-VALURI TIPIĊI TAL-KONTROLL

Ta' min jinnota li dawn il-valuri tal-kontroll huma bbażati fuq numru limitat ta' studji ta' validazzjoni, u jistgħu jkunu soġġetti għall-emendar fid-dawl ta' esperjenza ulterjuri.

Tkabbir

Il-kejlijiet tal-piż u tat-tul jittieħdu għall-ħut kollu fil-kampjun fid-9 (jew fl-10) u fil-15-il ġimgħa wara l-fertilizzazzjoni (wpf). Is-segwitu ta' dan il-protokoll irendi l-piżijiet imxarrba mistennija fid-9 wpf ta' 85-145 mg għall-irġiel u ta' 95-150 mg għan-nisa. Il-piżijiet mistennija fil-15-il wpf huma ta' 250-330 mg għall-irġiel u ta' 280-350 mg għan-nisa. Filwaqt li jista' jkun hemm devjazzjonijiet sostanzjali minn dawn il-meded għal ħut individwali, piżijiet medji tal-kontroll sostanzjalment barra minn dawn il-meded, speċjalment anqas, ikunu jissuġġerixxu problemi fit-tagħlif, fil-kontroll tat-temperatura, fil-kwalità tal-ilma, mard jew xi taħlita ta' dawn il-fatturi.

Tifqis

Is-suċċess tat-tifqis fil-kontrolli tipikament ikun madwar id-90 %, madankollu mhumiex rari valuri baxxi sa 80 %. Suċċess tat-tifqis ta' anqas minn 75 % jista' jindika aġitazzjoni insuffiċjenti tal-bajd tal-iżvilupp jew attenzjoni inadegwata fl-immaniġġjar tal-bajd bħan-nuqqas ta' tneħħija fil-ħin tal-bajd mejjet li jwassal għal infestazzjoni fungali.

Sopravivenza

Ir-rati ta' sopravivenza sat-3 wpf mit-tifqis u wara t-3 wpf normalment ikunu ta' 90 % jew aktar għall-kontrolli iżda r-rati ta' sopravivenza fl-istadji bikrin tal-ħajja li jiżlu sa 80 % għall-kontrolli mhumiex allarmanti. Rati ta' sopravivenza fil-kontrolli ta' anqas minn 80 % ikunu ta' tħassib u jistgħu jindikwa tindif insuffiċjenti tal-akkwarji li jwassal għal telf tal-ħut larvali permezz ta' mard jew minħabba soffokazzjoni minħabba livelli baxxi ta' ossiġenu dissolt. Il-mortalità tista' sseħħ ukoll minħabba korriment matul it-tindif tat-tankijiet u minħabba t-telf ta' ħut larvali fis-sistema tad-drenaġġ tat-tank.

Il-ġene vitelloġenina

Filwaqt li l-livelli assoluti tal-ġene *vitelloġenina* (*vtg*), espressi bħala kopji/ng tal-mRNA totali, jistgħu jvarjaw ħafna bejn il-laboratorji minħabba l-proċeduri u l-istrumenti użati, il-proporzjon tal-*vtg* għandu jkun madwar 200 darba akbar fin-nisa tal-kontroll kontra l-irġiel tal-kontroll. Mhijiex xi ħaġa rari li dan il-proporzjon ikun għoli bejn 1 000 u 2 000, iżda proporzjonijiet anqas minn 200 huma suspettużi u jistgħu jindikaw problemi ta' kontaminazzjoni fil-kampjun jew problemi bil-proċedura u/jew bir-reaġenti użati.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

Għall-irġiel, il-medda normali ta' Karatteristiċi Sesswali Sekondarji, definiti bħala n-numru totali ta' segmenti fir-raj tal-pinen tal-papilli tal-pinen anali, hi ta' 40-80 segment fid-9-10 wpf. Sal-15-il wpf, il-medda għall-irġiel tal-kontroll għandha tkun ta' madwar 80-120 u ta' 0 għan-nisa tal-kontroll. Għal raġunijiet mhux spjegati, f'każijiet rari ċerti rġiel ma jkollhom ebda papilla preżenti sad-9 wpf iżda peress li l-irġiel tal-kontroll kollha jiżviluppaw papilli sal-15-il wpf, dan aktarx li jkun ikkawżat minn żvilupp tardiv. Il-preżenza ta' papilli fin-nisa tal-kontroll tindika l-preżenza ta' rġiel XX fil-popolazzjoni.

▼**M8**

Irġiel XX

L-inċidenza normali ta' sfond ta' rġiel XX fil-koltura tidher li hi ta' madwar 4 % jew anqas f'25 °C bl-inċidenza li tiżdied aktar ma tiżdied it-temperatura. Għandhom jittieħdu passi biex jiġi minimizzat il-proporzjon ta' rġiel XX fil-popolazzjoni. Peress li l-inċidenza ta' rġiel XX tidher li għandha komponent ġenetiku u, għalhekk, tintiret, il-monitoraġġ tal-istokk tal-koltura u l-iżgurar li l-irġiel XX ma jintużawx għall-propagazzjoni tal-istokk tal-koltura huma mezz effettiv kif titnaqqas l-inċidenza tal-irġiel XX fil-popolazzjoni.

Attività ta' riproduzzjoni

L-attività ta' riproduzzjoni fir-repliki tal-kontroll għandha tiġi ssorveljata ta' kuljum qabel ma ssir il-valutazzjoni tal-fekondità. Il-pari tal-kontroll jistgħu jiġu vvalutati b'mod kwalitattiv viżwalment għal evidenza ta' attività ta' riproduzzjoni. Sat-12-14-il wpf, ħafna mill-pari tal-kontroll għandhom ikunu qed jirriproduċu. Numri baxxi ta' pari li jirriproduċu sa dan iż-żmien jindikaw problemi potenzjali fis-saħħa, fil-maturità jew fil-benessri tal-ħut.

Fekondità

Ġeneralment, medaka f'saħħithom, magħlufa sew ta' 12-14-il wpf jirriproduċu kuljum, u jipproduċu fil-medda ta' 15 sa 50 bajda kull jum. Il-produzzjoni tal-bajd għal 16 mill-24 par tat-tgħammir tal-kontroll rakkomandati (> 65 %) għandha tipproduċi aktar minn 20 bajda għal kull par kull jum u tista' tilħaq sa madwar 40 bajda kull jum. Anqas minn dan l-ammont jista' jindika pari tar-riproduzzjoni immaturi, mhux magħlufa kif suppost jew mhux f'saħħithom.

Fertilità

Il-perċentwal ta' bajd fertili għall-pari tar-riproduzzjoni tal-kontroll tipikament ikun fil-medda ta' 90 % b'valuri fil-parti medja sa superjuri tad-disgħinijiet li mhumiex rari. Rati tal-fertilità ta' anqas minn 80 % għall-bajd tal-kontroll huma suspettużi u jistgħu jindikaw individwi mhux f'saħħithom jew kundizzjonijiet tal-koltura mhux ideali.

▼**M8**

Appendiċi 5

EŻEMPJU TA' SKEDA TAT-TAGĦLIF

Eżempju ta' skeda tat-tagħlif biex jiġu żgurati tkabbir u żvilupp adegwati b'sostenn tar-riproduzzjoni robusta hu muri fit-Tabella 1. Devjazzjonijiet minn din l-iskeda ta' tagħlif jistgħu jkunu aċċettabbli, iżda hu rakkomandat li dawn jiġu ttestjati biex jiġi verifikat li jkunu osservati tkabbir u riproduzzjoni aċċettabbli. Biex tiġi segwita l-iskeda ta' tagħlif suġġerita, il-piż xott tal-gamblu tal-ilma mielaħ għal kull volum ta' sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ irid jiġi determinat qabel ma jinbeda t-test. Dan jista' jsir bl-użin ta' volum differenti tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ li tkun tnixxfet għal 24 siegħa f'60 °C fuq twaġen li jkunu ntiżnu minn qabel. Biex jingħata kont lill-piż tal-imluħ fis-sospensjoni magħquda, volum identiku tal-istess soluzzjoni tal-melħ użata fis-sospensjoni magħquda għandu jitnixxef, jintiżen u jitnaqqas ukoll mill-piż tas-sospensjoni magħquda xxottata tal-gamblu tal-ilma mielaħ. Inkella, il-gamblu tal-ilma mielaħ jista' jiġi ffiltrat u jitlaħlaħ b'ilma distillat qabel ma jiġi xxottat, u b'hekk tiġi eliminata l-ħtieġa li jitkejjel il-piż ta' imbjank tal-melħ. Din l-informazzjoni tintuża biex tikkonverti l-informazzjoni fit-Tabella minn piż xott tal-gamblu tal-ilma mielaħ għall-volum tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ li jrid jintema' lil kull ħuta. Barra minn hekk, hu rakkomandat li l-alikwoti tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ jintiżnu ta' kull ġimgħa biex jiġi verifikat il-piż xott korrett tal-gamblu tal-ilma mielaħ magħluf.

Tabella 1

Eżempju ta' skeda tat-tagħlif

Żmien (wara t-tifqis)	Gamblu tal-Ilma Mielaħ (mg piż xott/ħuta/jum)
Jum 1	0,5
Jum 2	0,5
Jum 3	0,6
Jum 4	0,7
Jum 5	0,8
Jum 6	1,0
Jum 7	1,3
Jum 8	1,7
Jum 9	2,2
Jum 10	2,8
Jum 11	3,5
Jum 12	4,2
Jum 13	4,5
Jum 14	4,8
Jum 15	5,2
Jiem 16-21	5,6

▼**M8**

Żmien (wara t-tifqis)	Gamblu tal-Ilma Mielaħ (mg piż xott/ħuta/jum)
Ġimgħa 4	7,7
Ġimgħa 5	9,0
Ġimgħa 6	11,0
Ġimgħa 7	13,5
Ġimgħa 8-sagrifiċċju	22,5

▼**M8**

Appendiċi 6

EŻEMPJI TA' KOMPARTIMENT TA' INKUBAZZJONI TAL-BAJD

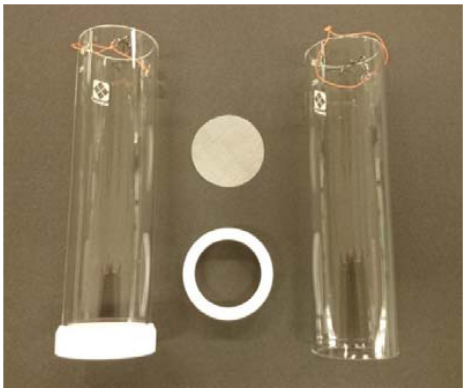
Eżempju A





Dan l-inkubatur jikkonsisti f'tubu ċentrifugu tal-ħġieġ transettat, konness b'pajp tal-azzar inossidabbli u miżmum f'postu bit-tapp tal-kamin ċentrifugu. Tubu żgħir tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli jipproġetta minn ġot-tapp u jitqiegħed qrib il-qiegħ ittondjat, filwaqt li jifforma bżieżaq tal-arja bil-galbu biex jissospendi l-bajd u jnaqqas it-trażmissjoni bejn il-bajd ta' infezzjonijiet fungali saprofitiċi filwaqt li jiffaċilita wkoll l-iskambju ta' sustanzi kimiċi bejn l-inkubatur u t-tank kontenitur.

Eżempju B



▼**M8**



Dan l-inkubatur jikkonsisti f'korp ċilindriku tal-ħġieġ (dijametru ta' 5 cm u għoli ta' 10 cm) u xibka tal-wajer inossidabbli (xibka ta' 0,25 φ u 32) li titqabbad mal-qiegħ tal-korp b'ċirku PTFE. L-inkubaturi jiġu sospiżi mill-iżbarra tal-irfigħ għat-tankijiet, u jitheżżu vertikalment (amplitudni ta' madwar 5 cm) f'ċiklu xieraq (bejn wieħed u ieħor darba kull 4 sekondi) għall-bajd tal-medaka.

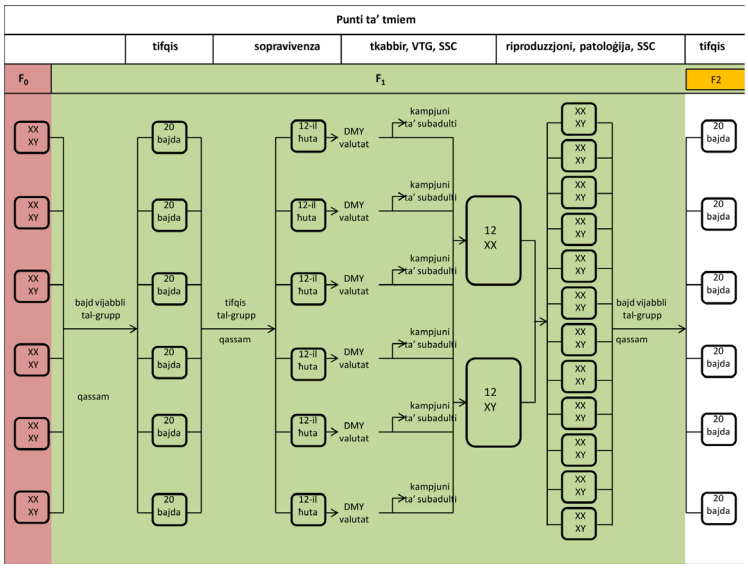
▼**M8**

Appendiċi 7

DIJAGRAMMA SKEMATIKA GĦAR-RAGGRUPPAR U GĦALL-POPOLAMENT TAR-REPLIKI FI ĦDAN IL-METODU TA' TTESTJAR MEOGRT

Figura 1

Ir-raggruppament u r-ripopolament tar-repliki fi ħdan l-MEOGRT. Il-figura tirrappreżenta trattament wieħed jew nofs ta' kontroll. Minħabba r-raggruppament, l-identità tar-repliki mhix kontinwa matul it-test. Kun af li t-terminu bajd jirreferi għal bajd vijabbli fertilizzati (ekwivalenti għal embrijuni).



Trattamenti u Replika.

Il-metodu ta' ttestjar jirrakkomanda ħames trattamenti tas-sustanza kimika tat-test li jużaw materjal ta' grad tekniku u kontroll negattiv. In-numru ta' repliki għal kull trattament ma jibqax kostanti matul l-MEOGRT, u n-numru ta' repliki fit-trattament tal-kontroll hu d-doppju ta' kwalunkwe trattament uniku bis-sustanza kimika tat-test. F'F0, kull trattament bis-sustanza kimika tat-test ikollu sitt repliki filwaqt li t-trattament bil-kontroll negattiv ikollu 12-il replika. Is-solventi huma ferm skoraġġuti, u jekk jintużaw, fir-rapport tal-MEOGRT għandha tiġi inkluża ġustifikazzjoni kemm għall-użu ta' solvent kif ukoll għall-għażla tas-solvent. Barra minn hekk, jekk jintuża solvent, ikun hemm bżonn ta' żewġ tipi ta' kontroll: a) kontroll b'solvent, u b) kontroll negattiv. Dawn iż-żewġ gruppi ta' kontroll ilkoll għandhom jikkonsistu f'komplement sħiħ ta' repliki fil-punti kollha fi ħdan l-iskeda ta' żmien tal-MEOGRT. Matul l-iżvilupp kollu tal-organiżmi tat-test fil-ġenerazzjoni F1 (u F2, sat-tifqis), din l-istruttura tar-repliki tibqa' l-istess. Madankollu, fl-istadju adult meta jiġu ffor-mati l-pari tat-tgħammir tal-F1, in-numru ta' repliki ta' pari tar-riproduzzjoni għal kull trattament jiġi rdoppjat b'mod ottimali; għaldaqstant, ikun hemm sa 12-il par ta' repliki f'kull trattament bis-sustanza kimika tat-test u 24 par ta' repliki fil-grupp tal-kontroll (u 24 par ta' repliki oħra fil-kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn). Id-determinazzjoni tat-tifqis mill-embrijuni riprodotti mill-pari tal-F1 issir bl-istess struttura ta' repliki kif saret għall-embrijuni riprodotti mill-pari tal-F0, jiġifieri inizjalment sitt repliki għal kull trattament bis-sustanza kimika tat-test u 12-il replika fil-grupp(i) tal-kontroll.

▼M8

Appendiċi 8

GĦADD TAL-PAPILLI TAL-PINEN ANALI

Materjali u Reaġenti Ewlenin

— Mikroskopju għad-dissezzjoni (b'kamera mqabbda fakultattiva)

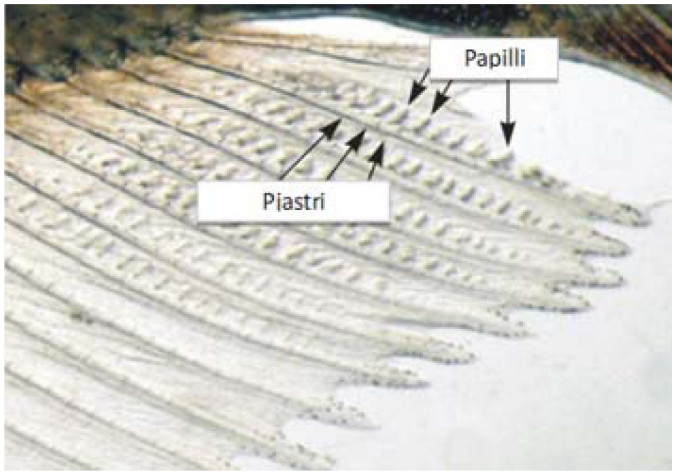
— Fissattiv (eż. ta' Davidson (ta' Bouin mhuwiex rakkomandat)), jekk ma jingħaddux mill-immaġni

Proċeduri

Wara n-nekroskopija, għandha tittieħed immaġni tal-pinna anali għall-għadd konvenjenti tal-papilli tal-pinen anali. Filwaqt li t-teħid ta' immaġnijiet hu l-metodu rakkomandat, il-pinna anali tista' tiġi ffissata b'fissattiv ta' Davidson jew b'fissattiv xieraq ieħor għal madwar minuta (1). Importanti li l-pinna anali tinżamm ċatta matul il-fissazzjoni biex il-papilli jkunu jistgħu jingħaddu aktar faċilment. Il-karkassa bil-pinna anali tista' tinħażen f'fissattiv ta' Davidson jew f'fissattiv xieraq ieħor sakemm tiġi analizzata. Għodd in-numru ta' pjastri konġunti (ara l-**Figura 1**) bil-papilli li jinfdu mill-marġni ta' wara tal-pjastra konġunta.

Figura 1

Papilli tal-pinna anali



▼M8

Appendiċi 9

SKEDA TA' ŻMIEN DETTALJATA TAL-MEOGRT

Ġimgħat tat-Test 1-3 (F0)

Il-ħut tal-ġenerazzjoni tal-F0 li jirriproduċi u li jissodisfa l-kriterji tal-għażla (ara l-para. 16-20) jiġi espost għal tliet ġimgħat biex il-gameti fl-iżvilupp u t-tessuti gonadali jkunu esposti għas-sustanza kimika tat-test. Kull tank ta' repliki jospita par wieħed ta' ħut tat-tgħammir (par tat-tgħammir ta' mara XX u ta' raġel XY). Il-bajd riprodott jinġabar, jingħadd u jiġi vvalutat għall-fertilità għal 21 jum konsekuttiv, b'bidu fil-Jum 1 tat-Test.

Ġimgħa 4 tat-Test (F0 u F1)

Idealment il-bajd fertilizzat u vijabbli (embrijuni) jinġabar f'jum wieħed; madankollu, jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni, l-embrijuni jistgħu jinġabru fuq jumejn. Jekk jinġabru wara jumejn, l-embrijuni kollha fi ħdan it-trattamenti li jkunu nġabru fl-ewwel jum jiġu raggruppati ma' dawk miġbura fit-tieni jum. Imbagħad, l-embrijuni raggruppati totali għal kull trattament jiġu distribwiti b'mod aleatorju f'kull wieħed mill-inkubaturi ta' repliki f'20 embrijun għal kull inkubatur. Il-mortalitajiet tal-bajd fertilizzat (embrijuni) jiġu verifikati u reġistrati ta' kuljum. Il-bajd mejjet jitneħħa mill-inkubaturi (mewt f'bajd fertilizzat jista' jiġi denotat, b'mod partikolari fl-istadji bikrin, b'telf notevoli ta' translučenza u tibdil fil-kulur, ikkawżat minn koagulazzjoni u/jew preċipitazzjoni tal-proteina, li jwasslu għal dehra opaka bajda; OECD 2010).

Nota: Jekk trattament wieħed ikun jeħtieġ it-tieni jum ta' ġbir, it-trattamenti kollha (inklużi l-kontrolli) iridu jsegwu din il-proċedura. Jekk wara t-tieni jum tal-ġbir ikun hemm numri inadegwati ta' embrijuni fi ħdan trattament biex jitgħabbew 20 embrijun għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' embrijuni mgħobbija fi ħdan dak it-trattament speċifiku għal 15-il embrijun għal kull inkubatur. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni biex jitgħabbew 15 għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' inkubaturi ta' repliki sakemm ikun hemm biżżejjed embrijuni għal 15 għal kull inkubatur. Barra minn hekk, jistgħu jiżdiedu aktar pari tat-tgħammir għal kull trattament u jistgħu jiżdiedu l-kontrolli f'F0 biex jipproduċu aktar bajd bl-għan li jintlaħqu l-20 rakkomandati għal kull replika.

Fil-Jum 24 tat-Test, il-pari tat-tgħammir F0 jinqatlu bl-ewtanażja u jittieħed rekord tal-piż u tat-tul. Jekk ikun hemm bżonn, il-pari tat-tgħammir F0 jistgħu jinżammu għal jum/jumejn addizzjonali biex terġa' tinbeda l-F1.

Ġimgħat tat-Test 5-6 (F1)

Jum sa jumejn qabel il-bidu antiċipat tat-tifqis, waqqaf jew naqqas l-aġitazzjoni tal-bajd tal-inkubazzjoni biex tħaffef it-tifqis. Peress li l-embrijuni jfaqqsu f'kull jum, l-imfaqqsa jiġu raggruppati skont it-trattament u jitqassmu b'mod sistematiku f'kull tank tal-larva ta' repliki fi ħdan trattament speċifiku b'mhux aktar minn 12-il imfaqqas. Dan isir bl-għażla aleatorja tal-imfaqqsa u bit-tqegħid ta' mfaqqas wieħed f'repliki suċċessivi fi grupp indiskriminat, bi proċedimenti skont l-ordni fir-repliki ta' trattament speċifiċi sakemm ir-repliki kollha fi ħdan it-trattament ikollhom 12-il imfaqqas. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed imfaqqsa biex jimtlew ir-repliki kollha, ara li l-akbar numru possibbli ta' repliki jkollhom 12-il imfaqqas biex jibdew il-fażi F1.

Il-bajd li ma jkunx għadu faqqas sad-doppju tal-jum medjan tal-kontroll jitqies mhux vijabbli u jintrema. In-numru ta' mfaqqsa jiġi reġistrat u s-suċċess tat-tifqis (il-kapaċità ta' tifqis) jiġi kkalkolat f'kull replika.

▼M8

Ġimgħat tat-Test 7-11 (F1)

Is-sopravivenza ta' ħut larvali tiġi verifikata u reġistrata kuljum fir-repliki kollha. Fil-Jum 43 tat-Test, in-numru ta' ħut li jkun għadu ħaj f'kull replika jiġi reġistrat kif ukoll in-numru tinizjali ta' mfaqqsa mqiegħda fir-replika (normalment tnax). Dan jippermetti għall-kalkolu tas-sopravivenza perċentwali mit-tifqis sal-istadju subadult.

Ġimgħa tat-Test 12 (F1)

Fil-Jiem 78-85 tat-Test, jittieħed kampjun żgħir mill-pinna tad-denb ta' kull ħuta biex jiġi determinat is-sess ġenotipiku tal-individwu (jiġifieri qtugħ tal-pinna) għall-ħut kollu. Din l-informazzjoni tintuża biex jiġu stabbiliti l-pari tat-tgħammir.

Fi żmien tliet ijiem wara li jiġi determinat is-sess ġenotipiku ta' kull ħuta, jiġu stabbiliti b'mod aleatorju 12-il par tat-tgħammir għal kull trattament u 24 par għal kull kontroll. Żewġ ħutiet XX u XY minn kull replika jintgħażlu b'mod aleatorju u mbagħad jiġu raggruppati skont is-sess, u mbagħad jintgħażlu b'mod aleatorju biex jistabbilixxu par tat-tgħammir (jiġifieri par XX-XY). Tal-anqas jiġu stabbiliti 12-il replika għal kull trattament kimiku u tal-anqas 24 replika għall-kontroll b'par tat-tgħammir wieħed għal kull replika. Jekk replika ma jkollhiex żewġ ħutiet XX jew żewġ ħutiet XY disponibbli għar-raggruppament, għandu jinkiseb il-ħut bil-ġenotip tal-ġeneru xieraq minn repliki oħra fi ħdan it-trattament.

Il-ħut li jifdal (massimu ta' tmien ħutiet għal kull replika) jinqatel bl-ewtanażja u jittieħed kampjun tiegħu għad-diversi punti ta' tmiem subadulti. Id-*data* tad-*dmy* (XX jew XY) għall-kampjuni subadulti kollha tinżamm biex jiġi żgurat li d-*data* tal-punti ta' tmiem kollha tkun tista' tiġi relatata mas-sess ġenetiku ta' kull ħuta individwali.

Ġimgħat tat-Test 13-14 (F1)

L-esponiment ikompli hekk kif il-pari ta' tgħammir ta' subadulti jiżviluppaw f'adulti. Fil-Jum 98 tat-Test (jiġifieri l-jum qabel ma jinbeda l-ġbir tal-bajd), il-bajd jitneħħa kemm mill-akkwarji kif ukoll min-nisa.

Ġimgħat tat-Test 15-17 (F1)

Il-bajd riprodott jinġabar ta' kuljum għal 21 jum konsekuttiv f'kull replika, u jiġi vvalutat għall-fekondità u għall-fertilità.

Ġimgħa 18 tat-Test (ripetizzjoni tal-Ġimgħa 4 tat-Test) (F1 u F2)

Fil-Jum 120 tat-Test, il-ġbir tal-bajd isir f'kull tank ta' repliki filgħodu. Il-bajd miġbur jiġi vvalutat u l-bajd fertilizzat (filamenti mneħħija) minn kull wieħed mill-pari tat-tgħammir jiġi raggruppat skont it-trattament, jitqassam b'mod sistematiku fil-kompartimenti ta' inkubazzjoni tal-bajd b'20 bajda fertilizzata għal kull inkubatur. L-inkubaturi jistgħu jitqiegħdu f'tankijiet inkubaturi separati stabbiliti għal kull trattament jew fit-tank ta' repliki li mat-tifqis se jkun fih il-larva mfaqqsa. Idealment l-embrijuni jinġabru f'jum wieħed; madankollu, jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni, l-embrijuni jistgħu jinġabru fuq jumejn. Jekk jinġabru wara jumejn, l-embrijuni kollha fi ħdan it-trattamenti li jkunu nġabru fl-ewwel jum jiġu raggruppati ma' dawk miġbura fit-tieni jum. Imbagħad, l-embrijuni raggruppati totali għal kull trattament jiġu distribwiti b'mod aleatorju f'kull wieħed mill-inkubaturi ta' repliki f'20 embrijun għal kull inkubatur. Nota: Jekk trattament wieħed ikun jeħtieġ it-tieni jum ta' ġbir, it-trattamenti kollha (inklużi l-kontrolli) iridu jsegwu din il-proċedura. Jekk wara t-tieni jum tal-ġbir ikun hemm numri inadegwati ta' embrijuni fi ħdan trattament biex jitgħabbew 20 embrijun għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' embrijuni mgħobbija fi ħdan

▼M8

dak it-trattament speċifiku għal 15-il embrijun għal kull inkubatur. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni biex jitgħabbew 15 għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' inkubaturi ta' repliki sakemm ikun hemm biżżejjed embrijuni għal 15 għal kull inkubatur.

Fil-Jum 121 tat-Test (jew fil-Jum 122 tat-Test, biex tiżgura li l-F2 bdiet sew), il-pari tat-tgħammir tal-F1 jinqatlu bl-ewtanażja u jiġu analizzati għall-punti ta' tmiem tal-adulti. Jekk ikun hemm bżonn, il-pari tat-tgħammir F1 jistgħu jinżammu għal jum/jumejn addizzjonali biex terġa' tinbeda l-F2.

Ġimgħat tat-Test 19-20 (F2)

Jum sa jumejn qabel il-bidu antiċipat tat-tifqis, waqqaf jew naqqas l-aġitazzjoni tal-bajd tal-inkubazzjoni biex tħaffef it-tifqis. Jekk it-test jiġi terminat bit-tlestija tat-tifqis tal-F2, kull jum l-imfaqqsa jingħaddu u jintremew. (L-embrijuni li ma jkunux għadhom faqqsu wara żmien twil ta' inkubazzjoni, definit bħala d-doppju tal-jum medjan tal-kontroll tat-tifqis, jitqiesu mhux vijabbli).

▼**M8**

Appendiċi 10

ANALIŻI STATISTIKA

It-tipi ta' *data* bijoloġika ġenerata fl-MEOGRT mhumiex uniċi għalih u ħlief għad-*data* dwar il-patoloġija, ġew żviluppati ħafna metodoloġiji statistiċi xierqa biex tiġi analizzata *data* simili skont il-karatteristiċi tad-*data* inklużi n-normalità, l-omoġenità tal-varjanza, jekk id-disinn tal-istudju jistax jiġi soġġett għall-ittestjar tal-ipoteżi jew għall-analiżi tar-rigressjoni, għal testijiet parametriċi kontra testijiet mhux parametriċi, eċċ. Bħala prinċipju ġenerali, l-analiżijiet statistiċi suġġeriti jsegwu r-rakkomandazzjonijiet tal-OECD għad-*data* dwar l-ekotossiċità (OECD 2006) u fil-Figura 2 hi pprovduta flowchart tad-deċiżjonijiet għall-analiżi tad-*data* tal-MEOGRT.

Hu supponut li spiss, is-settijiet ta' *data* juru risponsi monotoniċi. Barra minn hekk, għandha tiġi kkunsidrata l-kwistjoni ta' użu ta' test statistiku b'denb wieħed kontra test statistiku b'żewġt idnub. Sakemm ma jkunx hemm raġunament bijoloġiku li jagħmel test b'denb wieħed inadatt, hu suġġerit li jintużaw testijiet b'denb wieħed. Filwaqt li t-taqsima li ġejja tirrakkomanda ċerti testijiet statistiċi, jekk jiġu żviluppati metodi statistiċi aktar xierqa u/jew b'saħħithom għall-applikazzjoni għad-*data* speċifika ġenerata fl-MEOGRT, dawk it-testijiet statistiċi jintużaw biex jingranaw dawk il-vantaġġi.

Id-*data* tal-MEOGRT għandha tiġi analizzata b'mod separat għal kull sess ġenotipiku. Hemm żewġ strateġiji biex tiġi analizzata d-*data* mill-ħut b'sess imdawwar (irġiel XX jew nisa XY). 1) Tiċċensura d-*data* kollha minn ħut b'sess imdawwar fit-test kollu ħlief il-prevalenza tat-tidwir tas-sess f'kull replika. 2) Tħalli d-*data* mil-ħut kollu b'sess imdawwar fis-sett ta' *data* u tanalizza fuq il-bażi tal-ġenotip.

***Data* tal-istopatoloġija**

Id-*data* tal-istopatoloġija tiġi rapportata bħala punteġġi tas-severità li jiġu evalwati bl-użu ta' proċedura statistika żviluppata ġdida, Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al*., 2014). L-aġġustament *Rao-Scott* iżomm l-informazzjoni dwar ir-replika tat-test; il-proċedura *by Slices* tinkorpora l-aspettattiva bijoloġika li l-punteġġi tas-severità għandhom tendenza li jiżdiedu aktar ma jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet tat-trattament. Għal kull djanjożi, l-eżitu tal-RSCABS jispeċifika liema trattamenti għandhom prevalenza ogħla tal-patoloġija mill-kontrolli u l-livell ta' severità assoċjat.

***Data* dwar il-fekondità**

L-analiżijiet għad-*data* dwar il-fekondità jikkonsistu f'test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra jew ta' Williams biex jiġu determinati l-effetti tat-trattament, dment li d-*data* tkun konsistenti ma' rispons monotonu għall-konċentrazzjoni. B'test ta' tendenza ta' rigressjoni, kull tqabbil isir fil-livell ta' sinifikat ta' 0,05 u ma jsir ebda aġġustament għan-numru ta' paraguni. Id-*data* hi mistennija tkun konsistenti ma' rispons monotonu għall-konċentrazzjoni, iżda din tista' tiġi verifikata jew bi spezzjoni viżwali tad-*data* jew bil-bini ta' kuntrasti lineari u kwadratiċi tal-medji tat-trattament wara trasformazzjoni tal-ordni tal-klassifikazzjonijiet tad-*data*. Ħlief jekk il-kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u l-kuntrast lineari ma jkunx sinifikanti, isir it-test ta' tendenza. Inkella, jintuża t-test ta' Dunnett biex jiġu determinati l-effetti tat-trattament jekk id-*data* tiġi distribwita b'mod normali b'varjanzi omoġeni. Jekk dawk ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati, jintuża t-test ta' Dunn b'aġġustament ta' Bonferonni-Holm. It-testijiet indikati kollha jsiru b'mod indipendenti minn kwalunkwe test ġenerali F jew ta' Kruskal-Wallis Aktar dettalji huma pprovduti f'OECD 2006.

▼M8

Jistgħu jintużaw metodi alternattivi, bħal mudell lineari ġeneralizzat b'erruri ta' Poisson għall-għadd tal-bajd (b'ebda transformazzjoni), jekk dawn ikunu statistikament ġustifikati (Cameron u Trividi, 2013). Hu rakkomandat parir statistiku jekk jintuża approċċ alternattiv.

Għadd tal-Bajd ta' Kuljum fi ħdan Ġenerazzjoni Waħda

Il-mudell ANOVA jingħata b'Y=Żmien*Żmien+Trattament + *Trattament + Żmien*Trattament + *Żmien*Trattament, b'effetti aleatorji tar-Replika(Ġenerazzjoni*Trattament), u Żmien*Replika(Trattament), biex ikun jista' jkun hemm komponenti ta' varjanza mhux indaqs taż-żewġ tipi fost il-ġenerazzjonijiet. Hawnhekk Żmien tirreferi għall-frekwenza tal-għadd tal-bajd (eż., Jum jew Ġimgħa). Din hi analiżi b'kejlijiet ripetuti, bil-korrelazzjonijiet bejn l-osservazzjonijiet fl-istess repliki li jirrappreżentaw in-natura ta' kejlijiet ripetuti tad-*data*.

L-effetti ewlenin tat-trattament jiġu ttestjati bl-użu tat-test ta' Dunnett (jew Dunnett-Hsu), li jaġġusta għan-numru ta' paraguni. L-aġġustamenti għall-effett ewlieni tal-ġenerazzjoni jew tal-ħin huma meħtieġa, peress li b'dawn iż-żewġ fatturi, ma hemm ebda livell ta' kontroll u kull par ta' livelli hu paragun ta' interess possibbli. Għal dawn iż-żewġ effetti ewlenin, jekk it-test-F għall-effett ewlieni jkun sinifikanti fil-livell 0,05, il-paraguni bejn il-pari fil-livelli ta' dak il-fattur ikunu jistgħu jiġu ttestjati fil-livell ta' 0,05 mingħajr aġġustament ulterjuri.

Il-mudell jinkludi interazzjonijiet ta' żewġ u ta' tliet fatturi, biex effett ewlieni għal, pereżempju, żmien, ma jkunx jista' jkun sinifikanti, anki jekk iż-żmien ikollu impatt sinifikanti fuq ir-riżultati. B'hekk, jekk interazzjoni ta' żewġ jew ta' tliet fatturi li tinvolvi ż-żmien tkun sinifikanti fil-livell ta' 0,05, wieħed jista' jaċċetta l-paraguni tal-livelli tal-ħin fil-livell ta' sinifikat ta' 0,05 mingħajr aġġustament ulterjuri.

Imbagħad ikun imiss it-testijiet-F għas-sinifikat tat-trattament fi ħdan iż-żmien, l-hekk imsejħa slices fit-tabella ta' ANOVA. Jekk, pereżempju, is-slice għat-trattament fi ħdan F1 u ż-żmien 12, ikun sinifikanti fil-livell ta' 0,05, il-paraguni bejn il-pari għat-trattament fi ħdan F1 u ż-żmien 12 jistgħu jiġu aċċettati fil-livell ta' 0,05 mingħajr aġġustament ulterjuri. Japplikaw dikjarazzjonijiet simili għal testijiet għaż-żmien fi ħdan l-F1 u t-trattament u għall-ġenerazzjoni fi ħdan żmien u trattament.

Finalment, għall-paraguni li ma jaqgħux taħt xi waħda mill-kategoriji msemmija hawn fuq, il-paraguni għandhom ikunu aġġustati bl-użu tal-aġġustamenti ta' Bonferroni-Holm għall-valuri-p. Informazzjoni ulterjuri dwar l-analiżijiet tat-tali mudelli tista' tinstab f'Hocking (1985) u f'Hochberg u Tamhane (1987).

Inkella, id-*data* mhux proċessata tiġi reġistrata u ppreżentata fir-rapport tal-istudju bħala l-fekondità (numru ta' bajd) għal kull replika għal kull jum. Għandha tiġi kkalkolata l-medja tar-repliki tad-*data* mhux proċessata u mbagħad għandha tiġi applikata trasformazzjoni bl-għerq kwadrat. ANOVA f'direzzjoni waħda dwar il-medji tar-repliki trasformati għandha tiġi kkalkolata segwita mill-kuntrasti ta' Dunnett. Jista' jkun siewi wkoll li ssir spezzjoni viżwali tad-*data* dwar il-fekondità ta' kull trattament u/jew replika bi scatterplot li turi d-*data* maż-żmien. Din tippermetti li ssir valutazzjoni informali tal-effetti potenzjali maż-żmien.

Id-*data* bijoloġika l-oħra kollha

L-analiżjiet statistiċi huma bbażati fuq is-suppożizzjoni sottostanti li bl-għażla tad-doża xierqa, id-*data* tkun monotonika. B'hekk, id-*data* tiġi supponuta monotonika u tiġi evalwata b'mod formali għall-monotoniċità bl-użu ta' kuntrasti lineari u kwadratiċi. Jekk id-*data* tkun monotonika, hu rakkomandat li jsir test ta' tendenzi tal-medjani tar-repliki ta' Jonckheere-Terpstra (kif rakkomandat f'OECD 2006). Jekk il-kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u l-kuntrast lineari ma jkunx, id-*data* titqies mhux monotonika.

▼**M8**

Jekk id-*data* ma tkunx monotonika, b'mod partikolari minħabba r-rispons imnaqqas tal-ogħla trattament jew tal-ogħla żewġ trattamenti, għandha tingħata kunsiderazzjoni liċ-ċensura tas-sett ta' *data* biex l-analiżi ssir mingħajr dawk it-trattamenti. Din id-deċiżjoni jkollha ssir b'ġudizzju professjonali u bid-*data* disponibbli kollha, speċjalment id-*data* li tindika tossiċità ċara f'dawk il-livelli ta' trattament.

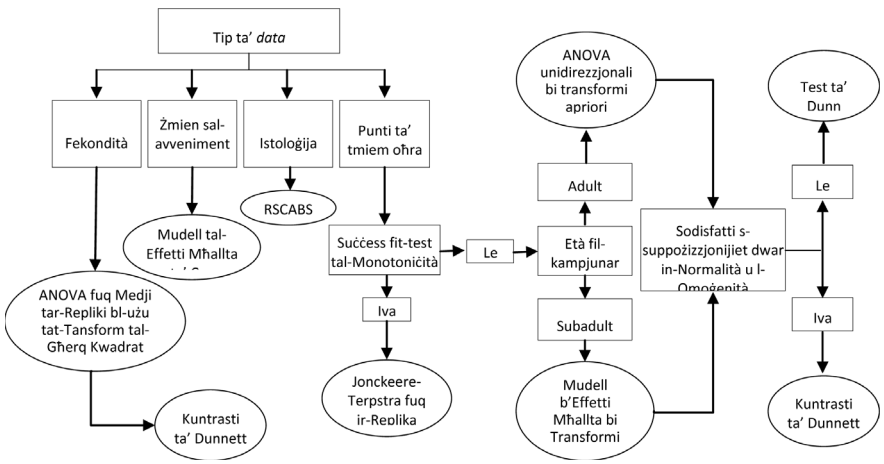
Għall-piż u għat-tul, ma hi rakkomandata ebda trasformazzjoni għalkemm din kultant tista' tkun neċessarja. Madankollu, trasformazzjoni tal-log hi rakkomandata għad-*data* dwar il-vitelloġenina; trasformazzjoni bl-għerq kwadrat hi rakkomandata għad-*data* dwar l-SSC (papilli tal-pinen anali); trasformazzjoni bl-għerq kwadrat arcsine hi rakkomandata għad-*data* dwar it-tifqis ta' proporzjon, għas-sopravivenza perċentwali, għall-proporzjon tas-sess, u għall-perċentwal tal-bajd fertili. Iż-żmien sat-tifqis u ż-żmien sal-ewwel riproduzzjoni għandhom jiġu trattati bħala *data* taż-żmien sa avveniment, bl-embrijuni individwali li ma jfaqqsux fil-perjodu definit jew bir-repliki li qatt ma jirriproduċu li jiġu trattati bħala *data* right-censored. Iż-żmien sat-tifqis għandu jiġi kkalkolat mill-jum medjan tat-tifqis ta' kull replika. Dawn il-punti ta' tmiem għandhom jiġu analizzati bl-użu tal-mudell ta' periklu proporzjonali ta' Cox b'effetti mħallta.

Id-*data* bijoloġika minn kampjuni ta' adulti jkollha kejl wieħed għal kull replika, jiġifieri, jkun hemm ħuta XX waħda u ħuta XY waħda għal kull akkwarju tar-repliki. Għaldaqstant, hu rakkomandat li ssir ANOVA f'riezzjoni waħda fuq il-medji tar-repliki. Jekk jiġu ssodisfati s-suppożizzjonijiet tal-ANOVA (normalità u omoġenità tal-varjanza kif valutati fuq ir-residwi tal-ANOVA bit-test ta' Sapiro-Wilks u bit-test ta' Levene, rispettivament), il-kuntrasti ta' Dunnett għandhom jintużaw biex jiġu determinati trattamenti li kienu differenti mill-kontroll. Min-naħa l-oħra, jekk is-suppożizzjonijiet tal-ANOVA ma jiġux issodisfati, għandu jsir test ta' Dunn biex jiġi determinat liema trattamenti kienu differenti mill-kontroll. Hi rakkomandata proċedura simili għal *data* li tkun fil-forma ta' perċentwali (fertilità, tifqis u sopravivenza).

Id-*data* bijoloġika minn kampjuni ta' subadulti għandha minn kejl sa tmien kejlijiet għal kull replika, jiġifieri, jista' jkun hemm numru varjabbli ta' individwi li jikkontribwixu għall-medja ta' repliki għal kull sess ġenotipiku. Għaldaqstant, hu rakkomandat li jintuża mudell tal-ANOVA b'effetti mħallta segwit minn kuntrasti ta' Dunnett, jekk jiġu ssodisfati s-suppożizzjonijiet dwar in-normalità u l-omoġenità tal-varjanza (fuq ir-residwi tal-ANOVA b'effetti mħallta). Jekk is-suppożizzjonijiet tal-ANOVA ma jiġux issodisfati, għandu jsir test ta' Dunn biex jiġi determinat liema trattamenti kienu differenti mill-kontroll.

Figura 2

Flow chart għall-proċeduri statistiċi rakkomandati għall-analiżi tad-*data* tal-MEOGRT.



▼**M8**

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC u Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y u Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. L-ASSAĠĠ TAT-TKABBIR U TAL-IŻVILUPP TAL-ANFIBJI LARVALI (LADGA)

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 241 (2015) tal-OECD. Il-ħtieġa ta' żvilupp u ta' validazzjoni ta' assaġġ li kapaċi jidentifika u jikkaratterizza l-konsegwenzi avversi tal-esponiment għal sustanzi kimiċi tossiċi fl-anfibji ġejja mit-tħassib li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkaġunaw effetti avversi kemm fuq il-bniedem kif ukoll fuq l-organiżmi selvaġġi. Il-linja gwida tat-test tal-OECD tal-Assaġġ tat-Tkabbir u tal-Iżvilupp tal-Anfibji Larvali (LAGDA) tiddeskrivi test tat-tossiċità bi speċi anfibja li jqis it-tkabbir u l-iżvilupp mill-fertilizzazzjoni sal-perjodu bikri meta l-ħut ikun għadu żgħir. Hu assaġġ (tipikament ta' 16-il ġimgħa) li jivvaluta l-iżvilupp bikri, il-metamorfosi, is-sopravivenza, it-tkabbir u l-maturazzjoni riproduttiva parzjali. Jippermetti wkoll il-kejl ta' sensiela ta' punti ta' tmiem oħra li jippermetti li ssir evalwazzjoni djanjostika ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali (EDCs) suspettati jew ta' tipi oħra ta' tossikanti għall-iżvilupp u għar-riproduzzjoni. Il-metodu deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar hu derivat mill-ħidma ta' validazzjoni fuq iż-żriniġ Afrikan bil-qawqba (*Xenopus laevis*) mill-U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) b'ħidma ta' sostenn fil-Ġappun (1). Għalkemm l-ispeċi anfibja tista' tiġi adattata għal protokoll tat-test tat-tkabbir u tal-iżvilupp bil-ħila li jiddetermina s-sess ġenetiku li hi komponent importanti, il-metodi speċifiċi u l-punti ta' tmiem osservazzjonali spjegati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma applikabbli għall-*Xenopus laevis* biss.

2. Il-LAGDA jservi bħala test ta' livell ogħla b'anfibju għall-ġbir ta' informazzjoni aktar komprensiva dwar ir-rispons għall-konċentrazzjoni dwar l-effetti avversi xierqa għall-użu fl-identifikazzjoni u fil-karatterizzazzjoni tal-perikli, u f'valutazzjoni tar-riskju ekoloġiku. L-assaġġ joqgħod fil-Livell 4 tal-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali, fejn l-assaġġi *in vivo* jipprovdi *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti (2). Id-disinn ġenerali tal-esperiment jinvolvi l-esponiment tal-embrijuni ta' *X. laevis* fl-istadju 8-10 ta' Nieuwkoop u Faber (NF) (3) għal minimu ta' erba' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test (ġeneralment imqassma f'intervalli mhux anqas minn nofs logaritmiċi) u kontroll(i) sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 tal-NF fil-kontroll, b'subkampjun interim wieħed fl-istadju 62 tal-NF (≤ 45 wara l-fertilizzazzjoni; normalment madwar 45 jum (dpf). Hemm erba' repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test bi tmien repliki għall-kontroll. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment (fis-subkampjun interim u fil-kampjun finali mat-tlestija tat-test) jinkludu dawk indikattivi ta' tossiċità ġeneralizzata: il-mortalità, l-imġiba anormali, u d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (it-tul u l-piż) kif ukoll il-punti ta' tmiem imfassla biex jikkaratterizzaw modalitajiet ta' azzjoni speċifiċi dwar it-tossiċità endokrinali mmirati lejn il-proċessi fiżjoloġiċi medjati bl-estroġenu, bl-androġenu jew bit-tirojde. Il-metodu jixħet enfasi primarja fuq l-effetti potenzjali rilevanti

▼M8

għall-popolazzjoni (jiġifieri l-impatti avversi fuq is-sopravivenza, l-iżvilupp, it-tkabbir u l-iżvilupp riproduttiv) għall-kalkolu ta' Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) jew Konċentrazzjoni b'Effett li tikkawża tibdil ta' × % (Ecx) fil-punt ta' tmiem imkejjel. Għalkemm ta' min jinnota li l-approċċi tal-ECx rarament ikunu xierqa għal studji kbar ta' dan it-tip fejn iż-żieda tan-numru tal-konċentrazzjonijiet tat-test biex tkun tista' tiġi determinata l-ECx mixtieqa tista' tkun imprattika. Ta' min jinnota li l-metodu ma jkoprix il-fażi riproduttiva nfisha. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Minħabba n-numru limitat ta' sustanzi kimiċi ttestjati u ta' laboratorji involuti fil-validazzjoni ta' dan l-assaġġ kemxejn kumpless, speċjalment minħabba li r-riproduċibbiltà interlaboratorja mhix dokumentata b'*data* sperimentali s'issa, hu antiċipat li la jkun hemm numru suffiċjenti ta' studji disponibbli biex jiġi żgurat l-impatt ta' dan id-disinn il-ġdid tal-istudju, il-linja gwida tat-test 241 tal-OECD se tiġi rieżaminata u, jekk ikun hemm bżonn, riveduta, fid-dawl tal-esperjenza miksuba. Il-LAGDA hu assaġġ importanti biex jiġu indirizzati l-kontributuri importanti għat-tnaqqis fil-popolazzjoni anfibja bl-evalwazzjoni tal-effetti mill-esponiment għal sustanzi kimiċi matul l-istadju larvali sensittiv, fejn l-effetti fuq is-sopravivenza u l-iżvilupp, inkluż l-iżvilupp normali tal-organi riproduttivi, jistgħu jaffettwaw il-popolazzjonijiet b'mod avvers.

4. It-test hu mfassal biex jindividwa effett(i) apiċi li jirriżultaw kemm minn mekkaniżmi endokrinali kif ukoll minn dawk mhux endokrinali, u jinkludi punti ta' tmiem djanjostiċi li huma parzjalment speċifiċi għal modalitajiet endokrinali ewlenin. Ta' min jinnota li sakemm ġie żviluppat il-LAGDA, ma kien jeżisti ebda assaġġ validat li jservi din il-funzjoni għall-anfibji.

5. Qabel ma jinbeda l-assaġġ, importanti li wieħed ikollu informazzjoni dwar il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, b'mod partikolari biex ikunu jistgħu jiġu prodotti soluzzjonijiet kimiċi stabbli. Hu neċessarju wkoll li jkun hemm metodu analitiku sensittiv b'mod adegwat għall-verifika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Fuq durata ta' bejn wieħed u ieħor 16-il ġimgħa, l-assaġġ jeħtieġ numru totali ta' 480 annimal, jiġifieri embrijuni *X. laevis* (jew 640 embrijun, jekk jintuża kontroll b'solvent) biex tiġi żgurata saħħa suffiċjenti tat-test għall-evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem rilevanti għall-popolazzjoni bħat-tkabbir, l-iżvilupp u l-maturazzjoni riproduttiva.

6. Qabel l-użu tal-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar regolatorju ta' taħlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk hux se jipprovdi riżultati aċċettabbli għall-iskop regolatorju maħsub. Barra minn hekk, dan l-assaġġ ma jevalwax il-fekondità direttament, u allura jaf ma jkun applikabbli għall-użu fi stadju aktar avvanzat mil-Livell 4 tal-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali.

BAŻI XJENTIFIKA GĦALL-METODU TA' TTESTJAR

7. Ħafna mill-fehim kurrenti tagħha dwar il-bijoloġija anfibja nkiseb bl-użu tal-ispeċi mudell tal-laboratorju *X. laevis*. Din l-ispeċi tista' tiġi kolturata bħala rutina fil-laboratorju, l-ovulazzjoni tista' tiġi indotta bl-użu ta' gonadotropina korjonika umana (hCG) u l-istokkijiet tal-annimali huma disponibbli minnufih mingħand nissiela kummerċjali.

▼**M8**

8. Bħall-vertebrati kollha, ir-riproduzzjoni fl-anfibji hi taħt il-kontroll tal-assi ipotalamiku pitwitarju gonadali (HPG) (4). L-estroġeni u l-androġeni huma medjaturi ta' din is-sistema endokrinali, u jidderieġu l-iżvilupp u l-fiżjoloġija ta' tessuti sesswalment dimorfiċi. Hemm tliet fażijiet distinti fiċ-ċiklu tal-ħajja tal-anfibji meta dan l-ass ikun partikolarment attiv: (1) differenzazzjoni gonadali matul l-iżvilupp tal-larva, (2) l-iżvilupp ta' karatteristiċi sesswali sekondarji u maturazzjoni gonadali matul il-fażi li fiha l-anfibji jkunu għandhom qed jikbru u (3) ir-riproduzzjoni funzjonali tal-adulti. Kull waħda minn dawn it-tliet twieqi tal-iżvilupp aktarx li tkun suxxettibbli għal perturbazzjoni endokrinali minn ċerti sustanzi kimiċi bħal estroġeni u androġeni, u finalment twassal għal telfien tal-idoneità riproduttiva mill-organiżmi.

9. Il-gonadi jibdew bl-iżvilupp fl-istadju 43 tal-NF, meta jiżviluppa x-xifer ġentali bipotenzjali għall-ewwel darba. Id-differenzazzjoni tal-gonadi tibda fl-istadju 52 tal-NF meta ċ-ċelloli ġerminali primordjali jimigraw fit-tessut medullari (irġiel) jew jibqgħu fir-reġjun kortikali (nisa) tal-gonadi tal-iżvilupp (3). Dan il-proċess ta' differenzazzjoni sesswali tal-gonadi ġie rrapportat għall-ewwel darba bħala suxxettibbli għal alterazzjoi kimika f'*Xenopus* fil-ħamsinijiet (5) (6). L-esponiment tal-imrieżeb għall-estradjol matul dan il-perjodu ta' differenzazzjoni gonadali jirriżulta f'tibdil tas-sess tal-irġiel li, meta jsiru adulti, isiru nisa kompletament funzjonali (7) (8). It-tibdil tas-sess funzjonali tan-nisa f'irġiel hu possibbli wkoll u ġie rapportat wara l-impjantazzjoni tat-tessut tat-testikoli fl-imrieżeb (9). Madankollu, għalkemm l-esponiment għal inibitur tal-aromataži jikkawża tidwir tas-sess funzjonali wkoll f'*X. tropicalis* (10), dan ma ntweriex li jseħħ f'*X. laevis*. Storikament, l-effetti tossiċi fuq id-differenzazzjoni gonadali ġew ivvalutati b'eżami istoloġiku tal-gonadi fil-metamorfosi u t-tibdil tas-sess seta' jiġi determinat b'analiżi tal-proporzjonijiet tas-sess biss. Sa ftit taż-żmien ilu, ma kien hemm ebda mezz biex jiġi determinat b'mod dirett is-sess ġenetiku ta' *Xenopus*. Madankollu, stabbiliment riċenti ta' markaturi marbuta mas-sess f'*X. laevis* jagħmilha possibbli li jiġi determinat is-sess ġenetiku u jippermetti għall-identifikazzjoni diretta ta' annimali li jbiddlu s-sess (11).

10. Fl-irġiel, l-iżvilupp tal-ħut li jkun għadu qed jikber jipproċedi hekk kif il-livelli ta' testosteron fid-demm jiżdiedu b'mod korrispondenti għall-iżvilupp ta' karatteristiċi sesswali sekondarji kif ukoll għall-iżvilupp tat-testikoli. Fin-nisa, l-estradjol jiġi prodott mill-ovarji u jirriżulta fid-dehra tal-vitelloġenina (VTG) fil-plażma, f'ooċiti vitelloġeniċi fl-ovarju u fl-iżvilupp ta' ovidotti (12). L-ovidotti huma karatteristiċi sesswali sekondarji tan-nisa li jiffunzjonaw fil-maturazzjoni tal-ooċiti matul ir-riproduzzjoni. Il-kisjiet tal-ġelì jiġu applikati man-naħa ta' barra tal-ooċiti hekk kif jgħaddu mill-ovidott u jinġabru fil-borża tal-ovarju, lesti għall-fertilizzazzjoni. L-iżvilupp tal-ovidotti jidher li hu regolat mill-estroġeni hekk kif l-iżvilupp jikkorrelata mal-livelli ta' estradjol fid-demm f'*X. laevis* (13) u f'*X. tropicalis* (12). Ġie rrapportat l-iżvilupp ta' ovidotti fl-irġiel wara l-esponiment għal komposti tal-poliklorobifenili (14) u għal 4-*terz*-ottilfenol (15).

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Id-disinn tat-test jinvolvi l-esponiment tal-embrijuni ta' *X. laevis* fl-istadju 8-10 tal-NF permezz tar-rotta mal-ilma għal erba' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll għall-kontroll(i) sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 tal-NF fil-kontroll, b'subkampjun interim wieħed fl-istadju 62 tal-NF. Filwaqt li jista' jkun possibbli wkoll li sustanzi kimiċi ferm idrofobiċi jingħataw mal-għalf, s'issa ftit li xejn kien hemm esperjenza bl-użu ta' din ir-rotta ta' esponiment f'dan l-assaġġ. Hemm erba' repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test bi tmien repliki għal kull kontroll użat. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment jinkludu dawk li jindikaw tossiċità ġeneralizzata (jiġifieri l-mortalità, l-imġiba anormali u

▼M8

d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (tul u piż)), kif ukoll il-punti ta' tmiem imfassla biex jikkaratterizzaw modalitajiet ta' azzjoni speċifiċi tat-tossiċità endokrinali mmirati lejn proċessi fiżjoloġiċi medjati bl-estroġenu, bl-androġenu jew bit-tirojde (jiġifieri istopatoloġija tat-tirojde, istopatoloġija tal-gonadi u tal-kanal tal-gonadi, żvilupp anormali, vitelloġenina tal-plażma (fakultattiva), u proporzjonijiet tas-sess ġenotipiku/fenotipiku).

KRITERJI TA' VALIDITÀ TAT-TEST

12. Japplikaw il-kriterji li ġejjin għall-validità tat-test:

— Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun ≥ 40 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja matul it-test;

— It-temperatura tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 21 ± 1 °C u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbżu l-1,0 °C;

— Il-pH tas-soluzzjoni tat-test għandha tinżamm bejn 6,5 u 8,5, u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhiex taqbeż iż-0,5;

— Għandha tkun disponibbli evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla;

— Il-mortalità tul il-perjodu ta' esponiment għandha tkun ta' < 20 % f'kull replika fil-kontrolli;

— vijabbiltà ta' ≥ 70 % fis-suġġetti riprodotti magħżula biex jinbeda l-istudju;

— Iż-żmien medjan għall-istadju 62 tal-NF tal-kontrolli għandu jkun ta' ≤ 45 jum.

— Il-piż medju tal-organiżmi tat-test fl-istadju 62 tal-NF u fit-terminazzjoni tal-assaġġ fil-kontrolli u fil-kontrolli b'solvent (jekk użati) għandu jilħaq il-1,0 ± 0,2 u 11,5 ± 3 g, rispettivament.

13. Filwaqt li mhuwiex kriterju ta' validità, hu rakkomandat li jkun hemm disponibbli għall-analiżi tal-anqas tliet livelli ta' trattament bi tliet repliki mhux kompromessi. Mortalità eċċessiva, li tikkompromietti trattament, hi definita bħala > 4 mortalitajiet (> 20 %) f'2 repliki jew aktar li ma jistgħux jiġu spjegati minn errur tekniku. Tal-anqas tliet livelli ta' trattament mingħajr tossiċità ċara ovvja għandhom ikunu disponibbli għall-analiżi. Sinjali ta' tossiċità ċara jistgħu jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, żamma fil-wiċċ, tluq fil-qiegħ tat-tank, għawm invertit jew irregolari, nuqqas ta' attività ta' tlugħ fil-wiċċ, u nuqqas ta' rispons għal stimoli, anormalitajiet morfoloġiċi (*eż.* deformitajiet fl-estremitajiet), leżjonijiet emorraġiċi, u edema addominali.

14. F'każ ta' devjazzjoni mill-kriterji ta' validità tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tar-riżultati tat-test u dawn id-devjazzjonijiet u l-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapport tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODI

Apparat

15. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

(a) apparat għall-kontroll tat-temperatura (eż., ħiters jew berrieda aġġustabli sa 21 ± 1 °C);

▼M8

(b) termometru;

(c) mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari u għodod tad-dissezzjoni;

(d) kamera diġitali b'riżoluzzjoni minima ta' 4 megapixels u b'mikrofunzjoni (jekk meħtieġa);

(e) miżien analitiku li kapaċi jkejjel sa 0,001 mg jew 1 µg;

(f) apparat li jkejjel l-ossiġenu dissolt u apparat li jkejjel il-pH;

(g) apparat li jkejjel l-intensità tad-dawl li kapaċi jkejjel f'unitajiet lux;

L-ilma

Sors u kwalità

16. Jista' jintuża kwalukwe ilma ta' dilwizzjoni li jkun disponibbli lokalment (eż. ilma tan-nixxiegħa jew ilma tal-vit iffiltrat bil-faħam) u jippermetti tkabbir u żvilupp normali ta' *X. laevis*, u għandha tkun disponibbli evidenza ta' tkabbir normali f'dan l-ilma. Peress li l-kwalità tal-ilma lokali tista' tvarja b'mod sostanzjali bejn żona u oħra, għandha tiġi analizzata l-kwalità tal-ilma, b'mod partikolari jekk ma jkunx hemm disponibbli *data* storika dwar l-użu tal-ilma għat-trobbija tal-larva tal-anfibji. Il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), il-pestiċidi, il-karbonju organiku totali u s-solidi sospiżi għandu jsir qabel ma jibda l-ittestjar u/jew, perożempju, kull sitt xhur meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li jkun relattivament kostanti fil-kwalità. Ċerti karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2.

Konċentrazzjoni ta' jodur fl-ilma tat-test

17. Biex il-glandola tat-tirojde tissintetizza l-ormoni tat-tirojde biex issostni l-metamorfosi normali, irid jitqiegħed għad-dispożizzjoni biżżejjed jodur għal-larva permezz ta' taħlita ta' sorsi milwiema u djetetiċi. Bħalissa, ma hemm ebda linja gwida derivata empirikament għall-konċentrazzjonijiet minimi tal-jodur fl-ikel jew fl-ilma biex jiġi żgurat żvilupp xieraq. Madankollu, id-disponibbiltà tal-jodur tista' taffettwa r-risponsività tas-sistema tat-tirojde għal aġenti attivi fit-tirojde u hi magħrufa li timmodula l-attività tal-bażi tal-glandola tat-tirojde, u jistħoqqilha attenzjoni meta jiġu interpretati r-riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde. Fuq il-bażi tal-ħidma preċedenti, intwera li l-assaġġ irnexxa meta l-konċentrazzjonijiet tal-jodur (I⁻) fl-ilma ta' dilwizzjoni jvarjaw bejn 0,5 u 10 µg/l. Idealment, il-konċentrazzjoni minima tal-jodur fl-ilma ta' dilwizzjoni matul it-test għandha tkun ta' 0,5 µg/l (miżjud bħala melħ tas-sodju jew tal-potassju). Jekk l-ilma tat-test jiġi rikostitwit minn ilma dejonizzat, il-jodju għandu jiżdied b'konċentrazzjoni minima ta' 0,5 µg/l. Il-konċentrazzjonijiet imkejla tal-jodur mill-ilma tat-test (jiġifieri l-ilma ta' dilwizzjoni) u s-supplimentazzjoni tal-ilma tat-test ma' jodju jew ma' mluħ oħra (jekk jintużaw) għandhom jiġu rapportati. Il-kontenut ta' jodju jista' jitkejjel fl-ikel ukoll minbarra fl-ilma tat-test.

Sistema ta' esponiment

18. It-test ġie żviluppat bl-użu ta' sistema dilwitur bi fluss kontinwu. Il-komponenti tas-sistema għandu jkollhom komponenti li jmissu mal-ilma tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli u/jew ta' materjali kimikament inerti oħra. It-tankijiet ta' esponiment għandhom ikunu akkwarji tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli u l-volum utilizzabbli tat-tank għandu jkun bejn 4,0 u 10,0 l (fond minimu tal-ilma ta' 10 sa 15-il cm). Is-sistema għandha tkun tiflaħ għall-konċentrazzjonijiet tal-esponiment kollha, għal kontroll, u għal kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn, b'erba' repliki għal kull trattament u tmienja fil-kontrolli. Ir-rata tal-fluss għal kull tank għandha tkun kostanti wara li jingħata kont

▼M8

kemm liż-żamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll lill-esponiment kimiku. Hu rakkomandat li r-rati tal-fluss għandhom ikunu xierqa (*eż.* tal-anqas 5 tibdiliet tat-tank kuljum) biex jiġi evitat tnaqqis fil-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika minħabba metaboliżmu kemm mill-organiżmi tat-test kif ukoll mill-mikroorganiżmi akwatiċi fl-akkwarji jew fir-rotot abijotiċi ta' degradazzjoni (idroliżi, fotoliżi) jew dissipazzjoni (volatilizzazzjoni, sorbiment). It-tankijiet tat-trattament għandhom jiġu assenjati għal għarrieda għal pożizzjoni fis-sistema ta' esponiment biex jitnaqqsu l-effetti pożizzjonali potenzjali, inklużi ċaqliqiet żgħar fit-temperatura, l-intensità tad-dawl, *eċċ.* Aktar informazzjoni dwar kif jiġu stabbiliti sistemi ta' esponiment bi fluss kontinwu tista' tinkiseb mill-Gwida Standard tal-ASTM għat-Twettiq ta' Testijiet tat-Tossiċità Akuta fuq Materjali tat-Test b'Ħut, b'Makroinvertebrati, u b'Anfibji (16).

Twassil tas-sustanza kimika: tħejjija tas-soluzzjonijiet tat-test

19. Biex isiru s-soluzzjonijiet tat-test fis-sistema ta' esponiment, is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi dożata fis-sistema ta' esponiment b'pompa xierqa jew b'apparat ieħor. Ir-rata ta' fluss tas-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi kalibrata skont konferma analitika tas-soluzzjonijiet tat-test qabel it-tnedija tal-esponiment, u tiġi verifikata volumetrikament kull ċertu żmien matul it-test. Il-volum tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment għandu jiġġedded tal-anqas ħames darbiet kull jum.

20. Il-metodu użat biex is-sustanza kimika tat-test tiddaħħal fis-sistema jista' jvarja skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħha. Għaldaqstant, qabel it-test għandha tinkiseb informazzjoni bażi dwar is-sustanza kimika li tkun rilevanti għad-determinazzjoni tat-testabbiltà tagħha. Informazzjoni utli dwar il-proprjetajiet speċifiċi għas-sustanza kimika tat-test tinkludi l-formula strutturali, il-piż molekulari, il-purità, l-istabbiltà fl-ilma u fid-dawl, il-pK_a u l-K_{ow}, is-solubbiltà fl-ilma (idealment fil-medium tat-test) u l-pressjoni tal-fwar kif ukoll ir-riżultati ta' test għal bijodegradabbiltà immedjata (metodu ta' ttestjar C.4 (17) jew C.29 (18)). Is-solubbiltà u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jikkalkolaw il-kostant tal-liġi ta' Henry, li se jindika jekk it-telf minħabba l-evaporazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jistax iseħħ. It-twettiq ta' dan it-test mingħajr l-informazzjoni elenkata hawn fuq għandu jiġi kkunsidrat bir-reqqa peress li d-disinn tal-istudju se jkun jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test u, mingħajr dawn ir-riżultati tat-test għad-*data* jaf ikun diffiċli li jiġi interpretat jew ikun insinifikanti. Għandu jkun hemm metodu analitiku affidabbli disponibbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjonijiet tat-test, b'akkuratezza magħrufa u rapportata kif ukoll b'limitu ta' detezzjoni. Sustanzi kimiċi tat-test solubbli fl-ilma jistgħu jiġu dissolti f'alikwoti tal-ilma ta' dilwizzjoni f'konċentrazzjoni li tippermetti t-twassil bil-konċentrazzjoni tat-test fil-mira f'sistema bi fluss kontinwu. Sustanzi kimiċi li huma likwidi jew solidi f'temperatura ambejntali u moderatament solubbli fl-ilma jistgħu jkunu jeħtieġu saturaturi likwidu:likwidu jew likwidu:solidu (*eż.* kolonna tas-suf tal-ħġieġ) (19). Filwaqt li jista' jkun possibbli wkoll li sustanzi kimiċi tat-test idrofobiċi ħafna jingħataw mal-għalf, ftit li xejn kien hemm esperjenza bl-użu ta' dik ir-rotta ta' esponiment f'dan l-assaġġ.

21. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jitħejjew billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija preferibbilment għandha titħejja billi sempliċiment titħallat jew titħawwad is-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni b'mezzi mekkaniċi (eż. bit-tħawwid jew bl-ultrasonikazzjoni). Jistgħu jintużaw kolonni/sistemi ta' saturazzjoni jew metodi ta' dożaġġ passiv (20) biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Il-preferenza hi li tintuża sistema tat-test ħielsa minn kosolvent; madankollu, sustanzi kimiċi tat-test differenti ser ikollhom proprjetajiet fiżikokimiċi varji li aktarx li jkunu jeħtieġu approċċi differenti għat-tħejjija tal-ilma tal-esponiment tas-sustanza kimika. Għandu jittieħed kull sforz biex jiġu evitati

▼M8

solventi jew trasportaturi għaliex: (1) ċerti solventi nfushom jistgħu jirriżultaw f'tossiċità u/jew f'risponsi mhux mixtieqa jew mhux mistennija, (2) l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi f'livell ogħla mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom (hekk kif spiss jista' jseħħ bl-użu tas-solventi) jista' jirriżulta f'determinazzjonijiet impreċiżi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, (3) l-użu ta' solventi f'testijiet aktar fit-tul jista' jirriżulta fi grad sinifikanti ta' "biofilming" assoċjata ma' attività mikrobika li tista' tħalli impatt fuq il-kundizzjonijiet ambjentali kif ukoll fuq il-ħila li jinżammu l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment u (4) l-assenza ta' *data* storika li turi li s-solvent ma jinfluwenzax l-eżitu tal-istudju, l-użu ta' solventi jeħtieġ trattament ta' kontroll b'solvent li għandu implikazzjonijiet sinifikanti fuq il-benessri tal-annimali peress li jkunu meħtieġa annimali addizzjonali biex isir it-test. Għal sustanzi kimiċi li diffiċli tittestjahom, solvent jista' jintuża bħala l-aħħar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akkwatika ta' Sustanzi u ta' Taħlitiet Diffiċli (21) biex jiġi determinat l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent se tiġi determinata mill-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test u mid-disponibbiltà ta' *data* storika tal-kontroll dwar is-solvent. Fin-nuqqas ta' *data* storika, l-adegwatezza ta' solvent għandha tiġi determinata qabel ma jsir l-istudju definittiv. F'każ li l-użu ta' solvent ma jkunx evitabbli, u sseħħ attività mikrobika (biofilming), hu rakkomandat li jinżamm rekord/li jiġi rapportat dwar il-biofilming għal kull tank (tal-anqas kull ġimgħa) matul it-test sħiħ. Idealment, il-konċentrazzjoni tas-solvent għandha tinżamm kostanti fil-kontroll b'solvent u fit-trattamenti kollha tat-test. Jekk il-konċentrazzjoni tas-solvent ma tinżammx kostanti, għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni tas-solvent fit-trattament tat-test fil-kontroll b'solvent. F'każijiet li fihom jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet massimi tas-solvent ma għandhomx jaqbżu l-100 µl/l jew il-100 mg/l (21), u hu rakkomandat li l-konċentrazzjoni b'solvent tinżamm għall-anqas livell possibbli (*eż.* ≦20 µl/l) biex jiġu evitati effetti potenzjali tas-solvent fuq il-punti ta' tmiem imkejla (22).

L-annimali tat-test

Speċijiet tat-test

22. L-ispeċi tat-test hi *X. laevis* għaliex din: (1) tiġi kolturata bħala rutina f'laboratorji madwar id-dinja, (2) tinkiseb faċilment mingħand fornituri kummerċjali u (3) is-sess ġenetiku tagħha jista' jiġi determinat.

Tgħammir u indukrar tal-adulti

23. Kura u tgħammir xierqa ta' *X. laevis* huma deskritti minn linja gwida standardizzata (23). L-abitazzjoni u l-kura ta' *X. laevis* huma deskritti wkoll minn Read (24). Biex jiġi pprovokat it-tgħammir, tlieta sa ħames pari nisa u rġiel adulti jiġu injettati b'mod intraperitoneali b'gonadotropina korjonika umana (hCG). Eżemplari nisa u rġiel jiġu injettati b'eż., bejn wieħed u ieħor 800-1000 IU u 500-800 IU, rispettivament, ta' hCG dissolta f'0,6-0,9 % soluzzjoni salina (jew is-soluzzjoni taż-żrinġijiet ta' Ringer, salina isotonika għall-użu bl-anfibji). Il-volumi tal-injezzjoni għandhom ikunu madwar µl/g piż tal-ġisem (~1 000 µl). Wara, il-pari għat-tgħammir jinżammu f'tankijiet kbar, mhux disturbati u f'kundizzjonijiet statiċi biex tiġi promossa l-amplessi. Il-qiegħ ta' kull tank tat-tgħammir għandu jkollu qiegħ falz ta' xibka tal-azzar inossidabbli (eż. fetħiet ta' 1,25 cm) li tippermetti biex il-bajd jaqa' f'qiegħ it-tank. Iż-żrinġijiet injettati b'hCG aktar tard waranofsinhar normalment jiddepożitaw ħafna mill-bajd tagħhom sa nofs l-għodwa tal-għada. Wara li tinħeles u tiġi fertilizzata kwantità suffiċjenti ta' bajd, l-adulti għandhom jitneħħew mit-tankijiet tat-tgħammir. Imbagħad il-bajd jinġabar u r-riti tal-ġelì jitneħħew bi trattament taċ-ċisteina-L (23). Għandha titħejja soluzzjoni ta' 2 % ċisteina-L u l-pH għandha tiġi aġġustata għal 8,1 b'1 M NaOH. Din is-soluzzjoni ta' 21 °C tiżdied ma' flask Erlenmeyer ta' 500 ml li jkun fih il-bajd minn riproduzzjoni waħda u titħawwad ġentilment

▼M8

għal minuta jew żewġ minuti u mbagħad titlaħlaħ sew 6-8 darbiet b'ilma tal-koltura ta' 21 °C. Imbagħad il-bajd jiġi trasferit f'dixx kristallizzanti u jiġi determinat li jkun > 70 % vijabbli b'anormalitajiet minimi f'embrijuni li jesibixxu diviżjoni taċ-ċelloli.

DISINN TAT-TEST

Konċentrazzjonijiet tat-test

24. Hu rakkomandat li tal-anqas jintużaw erba' konċentrazzjonijiet kimiċi u kontrolli xierqa (inklużi kontrolli b'solvent, jekk ikun hemm bżonn). Ġeneralment tkun rakkomandata separazzjoni tal-konċentrazzjoni (fattur ta' spazjar) li ma taqbiżx it-3,2.

25. Għall-finijiet ta' dan it-test, ir-riżultati mill-istudji eżistenti fuq l-anfibji għandhom jintużaw sa fejn possibbli fid-determinazzjoni tal-ogħla konċentrazzjoni tat-test biex jiġu evitati konċentrazzjonijiet li jkunu tossiċi wisq. Informazzjoni minn, pereżempju, relazzjonijiet kwantitattivi bejn l-istruttura u l-attività, read across u *data* minn studji eżistenti fuq l-anfibji bħall-Assaġġ ta' Metamorfosi tal-Anfibji, il-metodu ta' ttestjar C.38 (25) u l-Assaġġ tat-Teratoġenesi tal-Embrijuni taż-Żrinġijiet - *Xenopus* (23) u/jew testijiet fuq ħut bħall-metodi ta' ttestjar C.48, C.41 u C.49 (26) (27) (28) jistgħu jikkontribwixxu għall-issettjar ta' din il-konċentrazzjoni. Qabel ma jsir il-LAGDA jista' jsir esperiment ta' sejbien tal-medda. Hu rakkomandat li l-esponiment tas-sejbien tal-medda tinbeda fi ħdan 24 siegħa mill-fertilizzazzjoni u tkompli għal 7-14-il jum (jew aktar, jekk ikun hemm bżonn) u l-konċentrazzjonijiet tat-test jiġu ssettjati b'tali mod li l-intervalli bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test ma jkunux akbar minn fattur ta' 10. Ir-riżultati tal-esperiment ta' sejbien tal-medda għandhom iservu biex tiġi ssettjata l-ogħla konċentrazzjoni tat-test fil-LAGDA. Kun af li jekk ikun intuża solvent, l-adegwatezza tas-solvent (jiġifieri jekk ikollux impatt fuq l-eżitu tal-istudju) tista' tiġi determinata bħala parti mill-istudju ta' sejbien tal-medda.

Repliki fi ħdan gruppi ta' trattament u kontrolli

26. Għandhom jintużaw minimu ta' erba' tankijiet ta' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test u minimu ta' tmien repliki għall-kontrolli (u l-kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn) (jiġifieri n-numru ta' repliki fil-kontroll u fi kwalunkwe kontroll b'solvent għandu jkun id-doppju tan-numru ta' repliki ta' kull grupp tat-trattament, biex tiġi żgurata saħħa statistika xierqa). Kull replika ma għandux ikun fiha aktar minn 20 annimal. In-numru minimu ta' annimali proċessati jkun ta' 15 (5 għas-subkampjun tal-istadju 62tal-NF u 10 ħutiet li għadhom qed jikbru). Madankollu, annimali addizzjonali jiżdiedu f'kull replika biex titqies il-possibbiltà ta' mortalità filwaqt li jinżamm in-numru kritiku ta' 15.

PROĊEDURA

Harsa ġenerali lejn l-assaġġ

27. L-assaġġ jitnieda b'embrijuni riprodotti ġodda (sadju 8-10 ta' NF) u jkompli tul l-iżvilupp tal-ħut li jkun għadu qed jikber. L-annimali jiġu eżaminati ta' kuljum għall-mortalità u għal kwalunkwe sinjal ta' mġiba anormali. Fl-istadju 62 ta' NF, jinġabar subkampjun ta' larva (sa ħames annimali għal kull replika) u jiġu eżaminati diversi punti ta' tmiem (Tabella 1). Wara li l-annimali jkollha jkunu laħqu l-istadju 66 ta' NF, jiġifieri t-tlestija tal-metamorfosi (jew wara 70 jum mit-tnedija tal-assaġġ, skont liem jiġi l-ewwel), isir qtil aleatorju (iżda mingħajr subkampjunar) biex

▼M8

in-numru ta' annimali jitnaqqas (10 għal kull tank) (ara l-paragrafu 43), u l-annimali li jifdal jkomplu bl-esponiment sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontroll. Fit-terminazzjoni tat-test (kampjunar tal-ħut li jkun għadu qed jikber) isiru kejlijiet addizzjonali (Tabella 1).

Kundizzjonijiet ta' esponiment

28. Sommarju sħiħ tal-parametri tat-test jista' jinstab fl-Appendiċi 3. Matul il-perjodu ta' esponiment, l-ossiġenu dissolt, it-temperatura, u l-pH tas-soluzzjonijiet tat-test għandhom jitkejlu ta' kuljum. Il-konduttività, l-alkalinità, u l-ebusija jitkejlu darba fix-xahar. Għat-temperatura tal-ilma tas-soluzzjonijiet tat-test, id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti (fi ħdan jum) ma għandhomx jaqbżu l-1,0 °C. Barra minn hekk, għall-pH tas-soluzzjonijiet tat-test, id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhiex taqbeż iż-0,5.

29. It-tankijiet ta' esponiment jistgħu jinġibdu b'sifun fuq bażi ta' kuljum biex jitneħħew ikel mhux mikul u prodotti tal-iskart, b'attenzjoni biex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata tat-tankijiet. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu mminimizzati l-istress u t-trawma għall-annimali, speċjalment matul iċ-ċaqliq, it-tindif tal-akkwarji, u l-manipolazzjoni. Kundizzjonijiet/attivitajiet ta' stress għandhom jiġu evitati bħal storbju qawwi u/jew bla heda, taptip fuq l-akkwarji, theżżiżiet fit-tank.

Id-durata tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test

30. L-esponiment jitnieda b'embrijuni riprodotti ġodda (stadju 8-10 ta' NF) u jitkompla sa għaxar ġimgħat wara ż-żmien medjan għall-istadju 62 ta' NF (≤ 45 jum mit-tnedija tal-assaġġ) fil-grupp tal-kontroll. Ġeneralment, id-durata tal-LAGDA hi ta' 16-il ġimgħa (massimu ta' 17-il ġimgħa).

Tnedija tal-assaġġ

31. Għandu jkun intwera minn qabel li l-annimali ġenituri użati għall-assaġġ jipproduċu wlied li jistgħu jitqassmu skont is-sess ġenetiku (Appendiċi 5). Wara r-riproduzzjoni bejn l-adulti, l-embrijuni jinġabru, u jiġu trattati b'ċisteina biex titneħħa r-rita tal-ġelì u jiġu skrinjati għall-vijabbiltà (23). It-trattament biċ-ċisteina jippermetti li l-embrijuni jiġu mmaniġġjati matul l-iskrinjar mingħajr ma jeħlu mas-superfiċji. L-iskrinjar iseħħ taħt mikroskopju tad-dissezzjoni bl-użu ta' kontagoċċi tal-għajnejn ta' daqs xieraq biex jitneħħew embrijuni mhux vijabbli. Idealment għat-test tintuża riproduzzjoni waħda li tirriżulta f'vijabbiltà ta' aktar minn 70 %. Embrijuni fl-istadju 8-10 ta' NF jitqassmu b'mod aleatorju f'tankijiet tat-trattament bl-esponiment li jkun fihom volum xieraq ta' ilma ta' dilwizzjoni sakemm kull tank ikun fih 20 embrijun. L-embrijuni għandhom jiġu mmaniġġjati b'attenzjoni matul dan it-trasferiment biex jitnaqqas kemm jista' jkun l-istress marbut mal-immaniġġjar u jiġi evitat milli jweġġgħu. 96 siegħa wara l-fertilizzazzjoni, l-imrieżeb għandhom ikunu telgħu fil-kolonna tal-ilma u bdew jaqbdu mal-ġnub tat-tank.

Reġim tal-għalf

32. L-għalf u r-rata tal-għalf jinbidlu matul l-istadji differenti tal-ħajja ta' *X. laevis* u huma aspett importanti ħafna tal-protokoll tal-LAGDA. Tagħlif eċċessiv matul il-fażi tal-larva tipikament jirriżulta f'inċidenzi akbar u f'severità akbar tal-iskoljożi (l-Appendiċi 8) u għandu jiġi evitat. Għall-kuntrarju, tagħlif inadegwat matul il-fażi tal-larva jirriżulta f'rati ta' żvilupp varjabbli ħafna fost il-kontrolli li potenzjalment jikkoprometti s-saħħa statistika

▼M8

jew iħawwad ir-riżultati tat-test. L-Appendiċi 4 jipprovdi dieta għal-larva u għall-ħut li jkun għadu qed jikber u reġimi tat-tagħlif rakkomandati għal *X. laevis* f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu, iżda alternattivi huma permissibbli dment li l-organiżmi tat-test jikbru u jiżviluppaw b'mod sodisfaċenti. Importanti li jiġi nnotat li jekk ikunu qed jitkejlu l-punti ta' tmiem speċifiċi għall-endokrina, l-għalf għandu jkun ħieles minn sustanzi attivi fl-endokrina bħall-grixa tas-sojja.

Tagħlif tal-larva

33. Id-dieta rakkomandata tal-larva tikkonsisti f'tagħlif tal-bidu għat-troti, f'diski tal-alga *Spirulina* u fi krisps tal-ħut aħmar (*eż.* TetraFin® flakes, Tetra, il-Ġermanja) imħallta flimkien f'ilma tal-koltura (jew tad-dilwizzjoni). Din it-taħlita tingħata tliet darbiet kuljum matul il-ġimgħa u darba kuljum fi tmiem il-ġimgħa. L-imrieżeb jitgħalfu wkoll gamblu tal-ilma mielaħ, *Artemia* spp., nauplii li jkollhom 24 siegħa, darbtejn kuljum matul il-ġimgħa u darba kuljum fi tmiem il-ġimgħa bl-ewwel jum li jaħbat il-jum 8 ta' wara l-fertilizzazzjoni. It-tagħlif tal-larva, li għandu jkun konsistenti f'kull reċipjent tat-test, għandu jippermetti tkabbir u żvilupp xierqa għall-annimali tat-test biex jiġu żgurati riproduċibbiltà u trasferibbiltà tar-riżultati tal-assaġġ: (1) iż-żmien medjan għall-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli għandu jkun ≤ 45 jum u hu rakkomandat (2) piż medju fi ħdan 1,0 ± 0,2 g fl-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli.

Tagħlif taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru

34. Ladarba titlesta l-metamorfosi, ir-reġim tat-tagħlif jikkonsisti f'ikel taż-żrinġijiet premium sinking, eż., Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, l-Istati Uniti) (Appendiċi 4). Għaż-żgħar taż-żrinġijiet (ħut fi stadju bikri li jkun għadu qed jikber), il-gerbub jingħadda għal ħin qsair f'mitħan tal-kafè, fi blender jew jitkisser b'mehrież u b'lida biex jitnaqqas id-daqs tagħhom. Ladarba l-ħut li jkun għadu qed jikber isir kbir biżżejjed biex jikkonsma gerbub sħiħ, it-tħin jew it-tkissir ma jibqax neċessarju. L-annimali għandhom jintemgħu darba kull jum. It-tagħlif tal-ħut li jkun għadu qed jikber għandu jippermetti tkabbir u żvilupp xierqa tal-organiżmi: hu rakkomandat piż medju fi ħdan 11,5 ± 3 g fil-ħut tal-kontroll li jkun għadu qed jikber fit-terminazzjoni tal-assaġġ.

Kimika analitika

35. Qabel it-tnedija tal-assaġġ, għandhom jiġu stabbiliti l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test (*eż.* is-solubbiltà, id-degradabbiltà, u l-volatilità) u l-metodi analitiċi kollha, *eż.* bl-użu tal-informazzjoni jew tal-għarfien eżistenti. Meta d-dożaġġ isir permezz tal-ilma ta' dilwizzjoni, hu rakkomandat li s-soluzzjonijiet tat-test minn kull tank ta' replika jiġu analizzati qabel it-tnedija tat-test biex tiġi verifikata l-prestazzjoni tas-sistema. Matul il-perjodu ta' esponiment, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli xierqa, idealment kull ġimgħa għal tal-anqas replika waħda f'kull grupp tat-trattament, b'rotazzjoni bejn ir-repliki tal-istess grupp tat-trattament kull ġimgħa. Hu rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla. Barra minn hekk, il-koeffiċjent ta' varjazzjoni (CV) tal-konċentrazzjonijiet tat-test imkejla tul il-perjodu sħiħ tat-test fi ħdan trattament għandu jinżamm għal 20 % jew anqas f'kull konċentrazzjoni. Meta l-konċentrazzjonijiet imkejla ma jibqgħux fi ħdan 80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali (pereżempju meta jiġu testjati sustanzi kimiċi ferm bijodegradabbli jew assorbenti), il-konċentrazzjonijiet tal-effetti għandhom jiġu determinati u espressi b'rabta mal-konċentrazzjoni medja aritmetika għat-testijiet bi fluss kontinwu.

▼M8

36. Ir-rati ta' fluss tal-ilma ta' dilwizzjoni u tas-soluzzjoni ewlenija għandhom jiġu verifikati f'intervalli xierqa (*eż.* tliet darbiet fil-ġimgħa) matul id-durata kollha tal-esponiment. Fil-każ ta' sustanzi kimiċi li ma jistgħux jiġu individwati fil-konċentrazzjonijiet nominali kollha jew f'uħud minnhom (*eż.* minħabba degradazzjoni jew assorbiment rapidi fir-reċipjenti tat-test, jew b'akkumulazzjoni kimika mmarkata fl-iġsma tal-annimali esposti), hu rakkomandat li r-rata ta' tiġdid tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment tiġi adattata biex il-konċentrazzjonijiet tat-test jinżammu kostanti kemm jista' jkun.

Osservazzjonijiet u kejlijiet tal-punti ta' tmiem

37. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment huma dawk indikativi tat-tossiċità inklużi l-mortalità, imġiba anormali bħal sinjali kliniċi ta' mard u/jew tossiċitajiet ġenerali, u d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (tul u piż), kif ukoll il-punti ta' tmiem tal-patoloġija li jistgħu jirrispondu għal modalitajiet ta' azzjoni tat-tossiċità ġenerali kif ukoll endokrinali mmirati lejn perkorsi medjati bl-estroġenu, bl-androġenu jew bit-tirojde. Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tista' titkejjel b'mod fakultattiv fit-terminazzjoni tal-assaġġ. Il-kejl tal-VTG jista' jkun siewi fil-fehim tar-riżultati tal-istudju fil-kuntest tal-mekkaniżmi endokrinali għall-EDCs suspettati. Il-punti ta' tmiem u t-tempestività tal-kejlijiet huma miġbura fil-qosor fit-Tabella 1.

Tabella 1

Harsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-LAGDA

Punti ta' Tmiem (*)	Kuljum	Kampjunar Interim (Kampjunar tal-larva)	Terminazzjoni tat-Test (Kampjunar tal-ħut li jkun għadu qed jikber)
Mortalità u anormalitajiet	X		
Żmien għall-istadju 62 ta' NF		X	
Isto(pato)loġija (glandola tat-tirojde)		X	
Morfometrika (tkabbir fil-piż u fit-tul)		X	X
Indiċi somatiku tal-fwied (LSI)			X
Proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku			X
Istopatoloġija (gonadi, kanali riproduttivi, kilwa u fwied)			X
Vitelloġenina (VTG) (fakultattiva)			X

(*) Il-punti ta' tmiem kollha jiġu analizzati statistikament

Il-mortalità u l-osservazzjonijiet ta' kuljum

38. It-tankijiet tat-test kollha għandhom jiġu verifikati kuljum għal annimali mejtin u l-mortalitajiet għandhom jiġu reġistrati għal kull tank. L-annimali mejtin għandhom jitneħħew mit-tank tat-test malli jiġu osservati. L-istadju tal-iżvilupp tal-annimali mejtin għandu jiġi kategorizzat bħala qabel l-istadju 68 ta' NF (emerġenza ta' qabel l-estremità ta' quddiem), l-istadju 58-62 ta' NF, l-istadju 63-66 ta' NF (bejn l-istadju 62 ta' NF u l-assorbiment tad-denb sħiħ), jew wara l-istadju 66 ta' NF (wara l-larva). Rati tal-mortalità li jaqbżu l-20 % jistgħu jindikaw kundizzjonijiet tat-test mhux xierqa jew effetti tossiċi ċari tas-sustanza

▼M8

kimika tat-test. L-annimali għandhom tendenza li jkunu sensittivi aktar għal avvenimenti tal-mortalità indotti mhux bil-kimika matul l-ewwel ftit jiem tal-iżvilupp wara l-avveniment ta' riproduzzjoni u matul il-climax metamorfika. Mortalità bħal din tista' tkun apparenti mid-*data* tal-kontroll.

39. Barra minn hekk, għandha tiġi reġistrata kwalunkwe osservazzjoni ta' mġiba anormali, ta' malformazzjonijiet viżibbli ċari (*eż.* skoljoži), jew ta' leżjonijiet. L-osservazzjonijiet ta' skoljoži għandhom jingħaddu (inċidenza) u jiġu gradati skont is-severità (*eż.* mhux rimarkabbli – NR, minima – 1, moderata – 2, severa – 3; Appendiċi 8). Għandhom jittieħdu sforzi biex jiġi żgurat li l-prevalenza ta' skoljoži moderata u severa tkun limitata (*eż.* anqas minn 10 % fil-kontrolli) matul l-istudju kollu, għalkemm prevalenza akbar ta' anormalitajiet fil-kontroll mhux bilfors tkun raġuni għat-twaqqif tat-test. Imġiba normali għal annimali larvali hi kkaratterizzata minn sospensjoni fil-kolonna tal-ilma bid-denb mgħolli 'l fuq fuq ir-ras, taħbit ritmiku regolari tal-pinna tad-denb, tlugħ perjodiku fil-wiċċ, operkulazzjoni, u risponsività għall-istimoli. Imġiba anormali tinkludi, pereżempju, meta jibqgħu fil-wiċċ, mimdudin f'qiegħ it-tank, jgħowmu b'lura jew b'mod irregolari, ma tantx ikunu attivi fil-wiċċ, u ma jkunux risponsivi għall-istimoli. Għall-annimali postmetamorfoċi, minbarra l-imġibiet anormali ta' hawn fuq, għandhom jiġu reġistrati differenzi kbar fil-konsum tal-ikel bejn it-trattamenti. Sfigurazzjonijiet u leżjonijiet kbar jistgħu jinkludi anormalitajiet morfoloġiċi (*eż.* deformitajiet tal-estremitajiet), leżjonijiet emorraġiċi, edema addominali, infezzjonijiet batterjali jew fungali, fost ħafna oħrajn. L-okkorrenzi ta' leżjonijiet fuq ras il-ħut li jkun għadu qed jikber, eżatt wara l-imnieħer, jistgħu jkunu indikazzjonijiet ta' livelli insuffiċjenti ta' umdità. Dawn il-kalkoli huma kwalitattivi u għandhom jitqiesu l-istess bħal sinjali kliniċi ta' mard/stress u jsiru f'paragun mal-annimali tal-kontroll. Jekk ir-rata ta' okkorrenza tkun akbar fit-tankijiet esposti milli fil-kontrolli, f'dak il-każ din għandha titqies bħala evidenza ta' tossiċità ċara.

Subkampjunar tal-larva

Spjegazzjoni tas-subkampjunar tal-larva:

40. L-imrieżeb li jilħqu l-istadju 62 ta' NF għandhom jitneħħew mit-tankijiet u jiġu kampjunati jew inkella jiġu mċaqlaqa għall-parti li jmiss tal-esponiment f'tank ġdid, jew inkella jiġu separati fiżikament mill-imrieżeb li jifdal fl-istess tank b'diviżur. L-imrieżeb jiġu verifikati ta' kuljum, u jiġi reġistrat il-jum tal-istudju li fih marżebb jilħaq l-istadju 62 ta' NF. Il-karatteristika definittiva għall-użu f'din il-valutazzjoni hi l-forma tar-ras tiċkien b'tali mod li bejn wieħed u ieħor tkun wiesgħa daqs il-korp tal-marżeb u l-estremitajiet ta' quddiem ikunu fil-livell tan-nofs tal-qalb, dak l-individwu jingħadd bħala li jkun laħaq l-istadju 62 ta' NF.

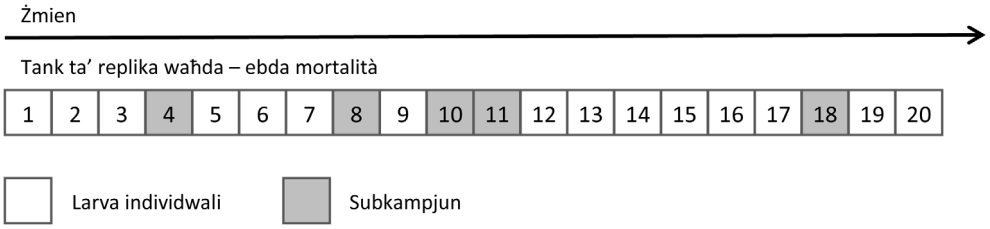
41. L-għan hu li jittieħed kampjun ta' ħames imrieżeb fl-istadju 62 ta' NF għal kull tank ta' replika. Dan għandu jsir b'mod għalkollox aleatorju, iżda deċiż *a priori*. Eżempju ipotetiku ta' tank ta' replika hu pprovdut fil-**Figura 1**. Jekk ikun hemm 20 marżebb li jibqgħu ħajjin f'tank partikolari meta l-ewwel individwu jilħaq l-istadju 62 ta' NF, għandhom jingħażlu ħames numri għal għarrieda minn 1-20. Il-marżebb #1 hu l-ewwel individwu li jlħaq l-istadju 62 ta' NF u l-marżebb #20 hu l-aħħar individwu f'tank li jilħaq l-istadju 62 ta' NF. Bl-istess mod, jekk ikun hemm 18-il larva li jibqgħu ħajjin f'tank, għandhom jintgħażlu ħames numri għal għarrieda minn 1-18. Dan għandu jsir għal kull tank ta' replika meta l-ewwel individwu fit-test jilħaq l-istadju 62 ta' NF. Jekk ikun hemm mortalitajiet matul l-ewwel kampjunar tal-istadju 62 ta' NF, il-kampjuni li jifdal iridu jerġgħu jintgħażlu b'mod aleatorju fuq il-bażi ta' kemm-il larva jkun fadal fl-istadju < 62 ta' NF u kemm-il kampjun ieħor ikun meħtieġ biex jintlaħaq total ta' ħames kampjuni minn dik ir-replika. Fil-jum li fih marżebb jilħaq l-istadju 62 ta' NF, isir riferiment

▼**M8**

għaċ-ċart tal-kampjunar imħejjija biex jiġi determinat jekk dak l-individwu jiġix kampjunat jew fiżikament separat mill-imrieżeb li jifdal għall-esponiment issoktat. Fl-eżempju pprovdut (Figura 1), l-ewwel individwu li jilħaq l-istadju 62 ta' NF (jiġifieri l-kaxxa #1) jiġi separat fiżikament mill-larva l-oħra, jibqa' jiġi espost u jiġi reġistrat l-jum tal-istudju li fih dak l-individwu jkun laħaq l-istadju 62 ta' NF. Imbagħad, l-individwi #2 u #3 jiġu trattati bl-istess mod bħal #1 u mbagħad l-individwu #4 jiġi kampjunat għat-tkabbir u għall-istoloġija tat-tirojde (skont dan l-eżempju). Din il-proċedura tkompli sakemm l-20 individwu jissieħeb mal-bqija tal-individwi ta' wara l-istadju 62 ta' NF jew inkella jiġi kampjunat. Il-proċedura għal għarrieda użata trid tagħti lil kull organiżmu tat-test probabbiltà ndaqs li jingħażel. Dan jista' jinkiseb billi jintuża kwalunkwe metodu ta' randomizzazzjoni, iżda jeħtieġ ukoll li kull marżebb jiġi nnettjat f'xi punt matul il-perjodu ta' subkampjunar tal-istadju 62 ta' NF.

Figura 1

Eżempju ipotetiku ta' reġim ta' kampjunar tal-istadju 62 ta' NF għal tank ta' replika wieħed



42. Għas-subkampjunar tal-larva, il-punti ta' tmiem miksuba huma: (1) iż-żmien għall-istadju 62 ta' NF (jiġifieri n-numru ta' jiem bejn il-fertilizzazzjoni u l-istadju 62 ta' NF), (2) l-anormalitajiet esterni, (3) il-morfometrika (*eż.* il-piż u t-tul) u (4) l-istoloġija tat-tirojde.

Il-qtil bl-ewtanażja tal-imrieżeb

43. Is-subkampjun ta' mrieżeb tal-istadju 62 ta' NF (5 individwi għal kull replika) għandu jiġi ewtanizzat b'immersjoni għal 30 minuta f'ammonti xierqa (*eż.* 500 ml) ta' soluzzjoni anestetika (*eż.* soluzzjoni ta' 0,3 % MS-222, sulfonat tal-metan trikaina, CAS.886-86-2). Is-soluzzjoni ta' MS-222 għandha tiġi bafferjata b'bikarbonat tas-sodju għal pH ta' bejn wieħed u ieħor 7,0 għaliex is-soluzzjoni mhux bafferrjata ta' MS-222 hi aċiduża u irritanti għall-ġilda taż-żrinġijiet u tirriżulta f'assorbiment batut u għal stress addizzjonali żejjed għall-organiżmi.

44. Bl-użu ta' kopp bil-malji, marżebb jitneħħa mill-kompartiment sperimentali u jiġi trasportat (jitqiegħed) fis-soluzzjoni tal-ewtanażja. L-annimal jiġi ewtanizzat kif xieraq u jkun lest għan-nekroskopija meta ma jkunx risponsiv għal stimoli esterni bħall-qris tal-estremità ta' wara b'par forċipi.

Morfometrika (il-piż u t-tul)

45. Il-kejlijiet tal-piż imxarrab (l-eqreb mg) u t-tul mill-imnieħer sal-bokka (SVL) (l-eqreb 0,1 mm) għal kull marżebb għandhom isiru eżatt wara li ma jibqax risponsiv b'anestetiku (Figura 2a). Jista' jintuża softwer ta' analiżi

▼M8

tal-immaġinijiet biex jitkejjel l-SVL minn ritratt. L-imrieżeb għandhom jiġu xxottati b'taptip qabel l-użin biex jitneħħa l-ilma aderenti żejjed. Wara li jittieħdu l-kejlijiet tal-qies tal-ġisem (piż u SVL), kwalunkwe anormalità morfoloġika ċara u/jew sinjal kliniku ta' tossiċità bħal skoljożi (ara l-Appendiċi 8), għandhom jiġu reġistrati jew innotati t-tbenġil u l-emorraġiji, u hi rakkomandata dokumentazzjoni diġitali. Kun af li t-tbenġil hu emorraġiji żgħar ħomor jew vjola fil-kapillari tal-ġilda.

Il-Ġbir u l-Fissazzjoni tat-Tessuti

46. Għas-subkampjun tal-larva, il-glandoli tat-tirojde jiġu vvalutati għall-istoloġija. It-torso inferjuri wara l-estremitajiet ta' quddiem jitneħħa u jintrema. Il-karkassa mirquma tiġi fissata f'fissattiv ta' Davidson. Il-volum tal-fissattiv fil-kontenitur għandu jkun tal-anqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. Għandha tinkiseb aġitazzjoni jew ċirkolazzjoni xierqa tal-fissattiv biex it-tessuti ta' interess jiġu fissati b'mod adegwat. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson għal tal-anqas 48 siegħa, iżda mhux għal aktar minn 96 siegħa, meta jitlaħalħu f'ilma dejonizzat u jinħażnu f'10 % formalina baferjata newtrali (1) (29).

Istoloġija tat-tirojde

47. Kull subkampjun tal-larva (tessuti fissati) jiġi valutat istoloġikament għall-glandoli tat-tirojde, jiġifieri djanjożi u gradazzjoni tas-severità (29) (30).

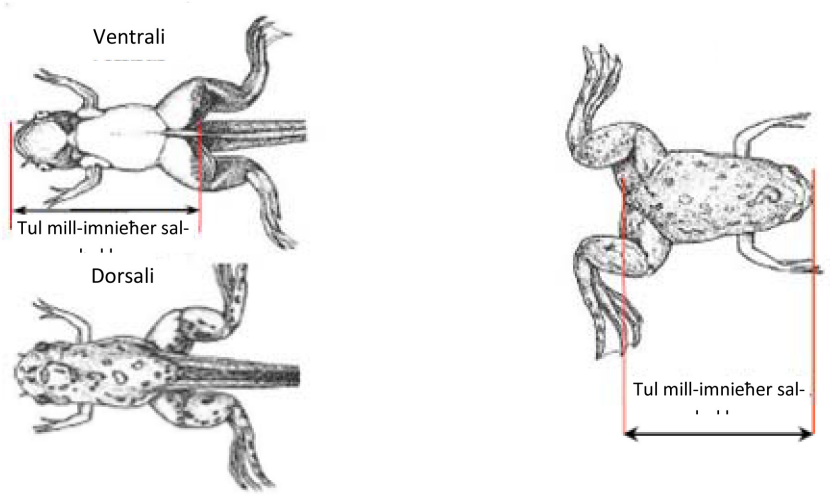


Figura 2: Il-punti ta' riferiment għall-kejl tat-tul mill-imnieħer sal-bokka għal-LAGDA fl-Istadju 62 ta' NF (a) u għaż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru (b). Il-karatteristiċi definittivi tal-istadju 62 ta' NF (a): ir-ras tkun l-istess wisgħa tal-ġisem, it-tul tal-nerv olfattiv ikun iqsar mid-dijametru tal-bulb olfattiv (perspettiva dorsali), u l-estremitajiet ta' quddiem ikunu fil-livell tal-qalb (perspettiva ventrali). Stampi adattati minn Nieuwkoop u Faber (1994).

Tmiem l-esponiment tal-larva

48. Fid-dawl tan-numru inizjali ta' mrieżeb, hu mistenni li aktarx li jkun hemm perċentwal żgħir ta' individwi li ma jiżviluppawx normalment u ma jlestux il-metamorfożi (stadju 66 ta' NF) f'ammont raġonevoli ta' żmien. Il-porzjon tal-larva tal-esponiment ma għandux jaqbeż is-70 jum. Kwalunkwe marżebb

▼M8

li jifdal fi tmiem dan il-perjodu għandu jiġi ewtanizzat (ara l-para. 43), jitkejlu l-piż imxarrab u l-SVL tiegħu, jitqassam fl-istadju skont Nieuwkoop u Faber, 1994, u għandha tittieħed nota ta' kwalunkwe anormalità fl-iżvilupp.

Qtil wara l-istadju 66 ta' NF

49. Għaxar individwi għal kull tank għandhom ikomplu mill-istadju 66 ta' NF (risorbiment tad-denb sħiħ) sat-terminazzjoni tal-esponiment. Għaldaqstant, wara li l-annimali kollha jilħaqu l-istadju 66 ta' NF jew wara 70 jum (skont liema jseħħ l-ewwel), għandu jsir il-qtil. Wara l-istadju 66 ta' NF l-annimali li ma jkunux ser ikomplu l-esponiment għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju.

50. L-annimali li ma jintgħażlux għall-esponiment issoktat jiġu ewtanizzati (ara l-para. 43). Għal kull annimali isiru l-kejlijiet tal-istadju tal-iżvilupp, tal-piż imxarrab u tal-SVL (Figura 2b) u nekroskopija grossa. Is-sess fenotipiku (fuq il-bażi tal-morfoloġija tal-gonadi) jiġi notat bħala femminili, maskili, jew indeterminat.

Kampjunar taż-Żrinġijiet li Jkunu Għadhom Qed Jikbru

Spjegazzjoni tal-kampjunar taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru

51. L-annimali li jifdal ikomplu bl-esponiment sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni (u/jew il-kontroll b'solvent jekk rilevanti). Wara tmiem il-perjodu ta' esponiment, l-annimali li jifdal (massimu ta' 10 żrinġijiet għal kull replika) jiġu ewtanizzati, u d-diversi punti ta' tmiem jitkejlu jew inkella jiġu evalwati u reġistrati: (1) il-morfometrika (piż u tul), (2) il-proporzjonijiet tas-sess fenotipiku/ġenotipiku, il-piż tal-fwied (Indiċi Somatiku tal-Fwied), (4) l-istopatoloġija (gonadi, kanali riproduttivi, fwied u kilwa) u, mhux bilfors, (5) il-VTG fil-plażma.

Il-qtil bl-ewtanażja tal-imrieżeb

52. Il-kampjuni ta' żrinġijiet postmetamorfiċi li jkunu għadhom qed jikbru jiġu ewtanizzati b'injezzjoni intraperitoneali ta' anestetiku, *eż.* 10 % MS-222 f'soluzzjoni baferjata tal-fosfat xierqa. Iż-żrinġijiet jistgħu jiġu kampjunati wara li ma jibqgħux risponsivi (normalment madwar 2 min wara l-injezzjoni, jekk jituża 10 % MS-222 f'dożaġġ ta' 0,01 ml għal kull g żrinġ). Filwaqt li ż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru jistgħu jitgħaddsu f'konċentrazzjoni ogħla ta' anestetiku (MS-222), l-esperjenza wriet li dawn jieħdu aktar żmien biex jiġu anestetizzati bl-użu ta' dan il-metodu u d-durata jaf ma tkunx adegwata biex tippermetti għall-kampjunar. L-injezzjoni tipprovdi ewtanażja effiċjenti u veloċi qabel il-kampjunar. Il-kampjunar ma għandux jinbeda sakemm jiġi kkonfermat in-nuqqas ta' risponsività taż-żrinġijiet biex jiġi żgurat li l-annimali jkunu mejtin. Jekk iż-żrinġijiet ikunu qed juru sinjali ta' tbatija konsiderevoli (serji ħafna u mewt jistgħu jitbassru b'mod affidabbli) u jitqiesu moribundi, l-annimali għandhom jiġu anestetizzati u ewtanizzati u trattati bħala mortalità għall-analiżi tad-*data*. Meta żrinġ jiġi ewtanizzat minħabba morbiditá, dan għandu jiġi notat u rapportat. Skont meta ż-żrinġ jiġi ewtanizzat matul l-istudju, iż-żrinġ jista' jinżamm għall-analiżi tal-istopatoloġija (iffissar taż-żrinġ għall-istopatoloġija possibbli).

Morfometrika (il-piż u t-tul)

53. Il-kejlijiet tal-piż imxarrab u tal-SVL (Figura 2b) huma identiċi għal dawk spjegati għas-subkampjunar tal-larva.

▼M8

VTG fil-plażma (fakultattiva)

54. Il-VTG hi bijomarkatur aċċettat b'mod ġenerali li jirriżulta mill-esponiment għal sustanzi kimiċi estroġeniċi. Għal-LAGDA, il-VTG fil-plażma tista' titkejjel, iżda mhux bilfors, fi ħdan kampjuni ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru (din tista' tkun partikolarment rilevanti jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tkun estroġenu).

55. L-estremitajiet ta' wara taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru jinqatgħu u d-demm jinġabar b'kapillari eparinizzata (għalkemm jistgħu jkunu xierqa metodi alternattivi għall-ġbir tad-demm, bħat-titqib kardijaku). Id-demm jinħeles f'tubu tal-mikroċentrifugu (*eż*. volum ta' 1,5 ml) u jiġi ċentrifugat biex tinkiseb il-plażma. Il-kampjuni tal-plażma għandhom jinħażnu f'-70 °C jew anqas sad-determinazzjoni tal-VTG. Il-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tista' titkejjel b'metodu ta' assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiku (ELISA) (Appendiċi 6), jew b'metodu alternattiv bħall-ispettrometrija tal-massa (31). Antikorpi speċifiċi tal-ispeċijiet huma preferuti minħabba sensittività akbar.

Determinazzjoni tas-sess ġenetiku

56. Is-sess ġenetiku ta' kull żriną li jkun għadu qed jikber jiġi vvalutat fuq il-bażi tal-markaturi żviluppati minn Yoshimoto *et al.* (11). Biex jiġi determinat is-sess ġenetiku, porzjon (jew biċċa sħiħa) ta' estremità waħda ta' wara (jew kwalunkwe tessut ieħor) imneħħi matul id-dissezzjoni jinġabar u jinħażen f'tubu tal-mikroċentrifugazzjoni (kampjuni tat-tessut miż-żrinġijiet jistgħu jinkisbu minn kwalunkwe tessut). It-tessut jista' jinħażen f'-20 °C jew anqas sal-iżolament tal-aċidu nuklejku deossiribożi (DNA). L-iżolament tad-DNA mit-tessuti jista' jsir b'kits kummerċjalment disponibbli u l-analiżi għall-preżenza jew għall-assenza tal-markatur issir b'metodu ta' reazzjoni katina bil-polimeraži (PCR) Appendiċi 5). Ġeneralment, il-konkordanza bejn is-sess istoloġiku u l-ġenotip fost l-annimali tal-kontroll fil-punt ta' żmien tal-kampjuanr taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru fil-gruppi tal-kontroll tkun ta' aktar minn 95 %.

Il-ġbir u l-fissazzjoni tat-tessuti għall-istopatoloġija

57. Il-gonadi, il-kanali riproduttivi, il-kliewi u l-fwied jinġabru għall-analiżi istoloġika matul il-kampjunar finali. Tinfetaħ il-kavità tal-addome, u l-fwied jiġi dissezzjonat u jintiżen. Imbagħad, l-organi diġestivi (*eż.* l-istonku, l-intestini) jitneħħew bir-reqqa mill-addome inferjuri biex jinkixfu l-gonadi, il-kliewi u l-kanali riproduttivi. Għandha tiġi nnotata kwalunkwe anormalità morfoloġika gross fil-gonadi. Finalment, l-estremitajiet ta' wara għandhom jitneħħew jekk ma jkunux tneħħew qabel għall-ġbir tad-demm. Il-fwied miġbur u l-karkassa bil-gonadi mħallija *in situ* għandhom jitqiegħdu f'fissattiv ta' Davidson minnufih. Il-volum tal-fissattiv fil-kontenitur għandu jkun tal-anqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson għal tal-anqas 48 siegħa, iżda mhux għal aktar minn 96 siegħa, meta jitlaħalħu f'ilma dejonizzat u jinħażnu f'10 % formalina baferjata newtrali (1) (29).

Istopatoloġija

58. Kull kampjun ta' żrinġijiet żgħar li jkunu għadhom qed jikbru jiġi evalwat istoloġikament għall-patoloġija fil-gonadi, fil-kanali riproduttivi, fil-kliewi u fit-tessut tal-fwied, jiġifieri djanjoži u gradazzjoni tas-severità (32). Il-fenotip tal-gonadi jinkiseb minn din l-evalwazzjoni wkoll (*eż*. l-ovarju, it-testikoli, l-intersess), u flimkien mal-kejlijiet individwali tas-sess ġenetiku, dawn l-osservazzjonijiet jistgħu jintużaw biex jiġu kkalkolati l-proporzjonijiet tas-sess fenotipiku/ġenotipiku.

▼M8

DATA U RAPPORTAR

Analiżi statistika

59. Il-LAGDA jiġġenera tliet forom ta' *data* li jridu jiġu analizzati statistikament: (1) *data* kontinwa kwantitattiva (piż, SVL, LSI, VTG), (2) id-*data* dwar iż-żmien sal-avveniment għar-rati ta' żvilupp (jiġifieri jiem sal-istadju 62 ta' NF mit-tnedija tal-assaġġ) u (3) id-*data* ordinali fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew tal-istadji tal-iżvilupp mill-evalwazzjonijiet tal-istopatoloġija.

60. Hu rakkomandat li d-disinn tat-test u l-għażla tat-test statistiku jippermettu saħħa adegwata li jiġu individwati tibdiliet ta' importanza bijoloġika f'punti ta' tmiem fejn trid tiġi rapportata NOEC jew ECx. Idealment, l-analiżijiet statistiċi tad-*data* (ġeneralment, replika tfisser bażi) għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument dwar l-Approċċi Kurrenti fl-Analiżi Statistika tad-Data dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (33). L-Appendiċi 7 ta' dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi s-siġra tad-deċiżjonijiet tal-analiżi statistika u gwida rakkomandati għat-trattament tad-*data* u fl-għażla tal-aktar test jew mudell statistiku xieraq li għandu jintuża fil-LAGDA.

61. Id-*data* mill-kampjunar taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru (*eż*., tkabbir, LSI) għandha tiġi analizzata għal kull sess ġenotipiku b'mod separat peress li s-sess ġenotipiku jiġu determinat għaż-żrinġijiet kollha.

Kunsiderazzjonijiet għall-analiżi tad-*data*

Użu ta' repliki u ta' trattamenti kompromessi

62. Repliki u trattamenti jistgħu jsiru kompromessi minħabba mortalità eċċessiva minn tossiċità ċara, minn mard jew minn errur tekniku. Jekk trattament ikun kompromess minn marda jew minn errur tekniku, għandu jkun hemm tliet trattamenti mhux kompromessi bi tliet repliki mhux kompromessi disponibbli għall-analiżi. Jekk isseħħ tossiċità ċara fit-trattament(i) għoli/għoljin, idealment ikun hemm tal-anqas tliet livelli ta' trattament bi tliet repliki mhux kompromessi disponibbli għall-analiżi (konsistenti mal-approċċ tal-Konċentrazzjoni Massima Tollerata għal-linji gwida tat-test tal-OECD (34)). Minbarra l-mortalità, sinjali ta' tossiċità ċara jistgħu jinkludu effetti fuq l-imġiba (eż. żamma fil-wiċċ, tluq fil-qiegħ tat-tank, għawm invertit jew irregolari, nuqqas ta' attività ta' tlugħ fil-wiċċ), leżjonijiet morfoloġiċi (eż. leżjonijiet emorraġiċi, edema addominali) jew inibizzjoni ta' risponsi normali tat-tagħlif meta mqabbla b'mod kwalitattiv ma' annimali tal-kontroll.

Kontrolli tas-solvent

63. Fit-terminazzjoni tat-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent (jekk jintuża). Dan isir permezz ta' paragun statistiku tal-grupp ta' kontroll b'solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. L-aktar punti ta' tmiem relevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analiżi huma d-determinanti tat-tkabbir (piż u tul), peress li dawn jistgħu jkunu affettwati permezz ta' tossiċitajiet ġeneralizzati. Jekk jinstabu differenzi statistikament sinifikanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-gruppi tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni u tal-kontroll b'solvent, għandu jintuża l-aħjar ġudizzju professjonali biex jiġi determinat jekk il-validità tat-test hix f'riskju. Jekk iż-żewġ kontrolli jvarjaw, it-trattamenti esposti għas-sustanza kimika għandhom jitqabblu mal-kontroll b'solvent sakemm ma jkunx magħruf li jkun preferut it-tqabbil mal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn iż-żewġ gruppi tal-kontroll, hu rakkomandat li t-trattamenti esposti għas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mar-raggruppati (gurppi tal-kontroll b'solvent u bl-ilma ta' dilwizzjoni), sakemm ma jkunx magħruf li t-tqabbil mal-grupp tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni jew tal-kontroll b'solvent biss hu preferut.

▼M8

Rapport tat-test

64. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test:

— L-għamla fiżika u, fejn rilevanti, il-proprjetajiet fiżjokimiċi;

— Sustanza monokostitwenti:

id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impuritajiet bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

— Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test:

— L-isem xjentifiku, ir-razza jekk disponibbli, is-sors u l-metodu tal-ġbir tal-bajd fertilizzat, u l-immaniġġjar sussegwenti.

— L-inċidenza tal-iskoljoży f'kontrolli storiċi għall-koltura ewlenija użata.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— Il-fotoperjodu/i;

— Id-disinn tat-test (*eż*. id-daqs tal-kompartiment, il-materjal u l-volum tal-ilma, in-numru ta' kompartimenti u ta' repliki tat-test, in-numru ta' organiżmi għal kull replika);

— Il-metodu ta' tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-frekwenza tat-tiġdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);

— Il-metodu li jintuża għad-dożaġġ tas-sustanza kimika tat-test (*eż*. pompi, sistemi ta' dilwizzjoni);

— L-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu li permezz tiegħu nkisbu u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;

— Il-karatteristiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli tal-kloru residwu (jekk jitkejjel), il-karbonju organiku totali (jekk jitkejjel), il-jodju totali, is-solidi sospiżi (jekk jitkejlu), is-salinità tal-medium tat-test (jekk titkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir;

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom;

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, it-temperatura (ta' kuljum) u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;

▼**M8**

— Informazzjoni dettaljata dwar it-tagħlif (*eż*. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza).

Ir-riżultati:

— Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji ta' validità;

— Id-*data* għall-kontroll (flimkien mal-kontroll b'solvent meta jintuża) u għall-gruppi tat-trattament kif ġej: il-mortalità u l-anormalità osservati, iż-żmien sal-istadju 62 ta' NF, il-valutazzjoni tal-istoloġija tat-tirojde (kampjun tal-larva biss), it-tkabbir (il-piż u t-tul), LSI (kampjun ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss), il-proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku (kampjun ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss), ir-riżultati tal-valutazzjoni tal-istopatoloġija għall-gonadi, għall-kanali riproduttivi, għall-kilwa u għall-fwied (kampjun taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss) u l-VTG fil-plażma (kampjun taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss, jekk issir);

— L-approċċ għall-analiżi statistika u għat-trattament tad-*data* (it-testijiet statistiċi u l-mudelli użati);

— Il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) għal kull rispons ivvalutat;

— Il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) għal kull rispons ivvalutat (f'α = 0,05); L-ECx għal kull rispons ivvalutat, jekk applikabbli, u l-intervalli ta' kunfidenza (*eż*. 95 %) u graff tal-mudell imdaħħal għall-kalkolu tagħha, il-pendil tal-kurva konċentrazzjoni rispons, il-formula tal-mudell ta' rigressjoni, il-parametri stmati tal-mudell u l-erruri standard tagħhom.

— Kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu ta' ttestjar u devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni, u kunsiderazzjonijiet tal-konsegwenzi potenzjali fuq l-eżitu tat-test.

65. Għar-riżultati tal-kejlijiet tal-punti ta' tmiem, għandhom jiġu ppreżentati l-valuri medji u d-devjazzjonijiet standard tagħhom (kemm fuq bażi ta' repliki kif ukoll fuq bażi ta' konċentrazzjoni, jekk possibbli).

66. Iż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli għandu jiġi kkalkolat u ppreżentat bħala l-medja tal-medjani tar-repliki u d-devjazzjoni standard tagħhom. Bl-istess mod, għat-trattamenti, medjan tat-trattament għandu jiġi kkalkolat u ppreżentat bħala l-medja tal-medjani tar-repliki u d-devjazzjoni standard tagħhom.

DOKUMENTAZZJONI

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(3) Nieuwkoop PD u Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, l-Istati Uniti.

(4) Kloas W u Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I u Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S u Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K u Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K u Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T u Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S u Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J u Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR u Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A u Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, l-Istati Uniti.

(17) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, It-Test Bijodegradabbiltà Lesta.

(18) Il-Kapitolu C.29 ta' dan l-Anness, Il-Bijodegradabbiltà Lesta - CO2 f'reċipjenti ssiġillati (Test tal-Ispazju Vojt Fuqani).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL u Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ u Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, l-Istati Uniti.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Ir-Renju Unit, 84 pp.

(25) Il-Kapitolu C.38 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Anfibji.

(26) Il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness: Assaġġ dwar ir-Riproduzzjoni Fuq Terminu Qasir tal-Ħut.

(27) Il-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut.

(28) Il-Kapitolu C.49 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta fuq l-Embrijuni tal-Ħut (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC u Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG u Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼M8

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Punt ta' tmiem apikali: Li jikkaġuna effett fil-livell tal-popolazzjoni.

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew taħlita

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku

ECx: (Konċentrazzjoni effettiva għal effett ta' x %) hi l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organiżmi tat-test f'perjodu ta' esponiment partikolari meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC50 hi konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' esponiment definit.

dpf: Jiem wara l-fertilizzazzjoni

Test bi fluss kontinwu: Test bi fluss kontinwu ta' soluzzjonijiet tat-test fis-sistema tat-test matul id-durata tal-esponiment.

Assi HPG: assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali

IUPAC: Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata.

Konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC): hi l-anqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test li fiha tiġi osservata s-sustanza kimika biex ikollha effett statistikament sinifikanti (f'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha li jkunu ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż daqs jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC). L-Appendiċi 7 jipprovdu gwida.

Konċentrazzjoni Letali Medjana (LC50): hi l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li hi stmata li tkun letali għal 50 % tal-organiżmi tat-test fid-durata tat-test.

Konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC): hi l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC, li meta mqabbla mal-kontroll, ma jkollha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$), f'perjodu ta' esponiment ddikjarat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qiegħda tiġi ttestjata permezz ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

VTG: Vitelloġenina hi prekursur tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment iseħħ f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

▼**M8**

Appendiċi 2

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjoni ta' limitu
Materja partikulata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromu	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Ħadid	1 µg/l
ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

▼**M8**

Appendiċi 3

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST GĦAL-LAGDA

1. Speċijiet tat-test	*Xenopus laevis*
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu,
3. Temperatura tal-ilma	It-temperatura nominali hi ta' 21 °C. It-temperatura medja tul id-durata tat-test hi ta' 21 ± 1 °C (id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbżu l-1,0 °C)
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa') 600-2000 lux (lumens/m^2) fis-superfiċje tal-ilma
5. Fotoperjodu	12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam
6. Volum tas-soluzzjoni tat-test u reċipjent tat-test (tank)	4-10 l (fond minimu ta' 10–15 cm tal-ilma) Tank tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli
7. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Kostant, f'kunsiderazzjoni kemm taż-żamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll tal-esponiment għas-sustanza kimika (*eż.* tiġdid tal-volum tat-tank għal ħames darbiet kull jum)
8. Età tal-organiżmi tat-test fil-bidu	Stadju 8-10 ta' Nieuwkoop u Faber (NF)
9. In-numru ta' organiżmi għal kull replika	20 annimal (embrijuni)/tank (replika) fil-bidu tal-esponiment u 10 annimali (li jkunu għadhom qed jikbru)/tank (replika) wara l-istadju 66 ta' NF sat-terminazzjoni tal-esponiment
10. In-numru ta' trattamenti	Minimu ta' erba' trattamenti bis-sustanza kimika tat-test flimkien mal-kontroll(i) xieraq/xierqa
11. In-numru ta' repliki għal kull trattament	Erba' repliki għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u 8 repliki għall-kontroll(1)
12. In-numru ta' organiżmi għal kull konċentrazzjoni tat-test	Minimu ta' 80 annimal għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u minimu ta' 160 annimal għall-kontroll(1)
13. Ilma ta' dilwizzjoni	Kwalunkwe ilma li jippermetti tkabbir u żvilupp normali ta' *X. laevis* (*eż.* ilma tan-nixxiegħa jew ilma tal-vit iffiltrat bil-faħam)
14. Ossiġenazzjoni	Ebda meħtieġa, iżda l-ossiġenazzjoni tat-tankijiet tista' tkun neċessarja jekk il-livelli ta' ossiġenu dissolt jonqsu anqas mil-limiti rakkomandati u ż-żidiet fil-fluss tas-soluzzjonijiet tat-test ikunu massimizzati.
15. Ossiġenu dissolt tas-soluzzjoni tat-test	Ossiġenu dissolt: ≥ 40 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja jew ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	Il-pH tas-soluzzjoni tat-test	6,5-8,5 (id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbżu iż-0,5)
17.	L-ebusija u l-alkalinità tas-soluzzjoni tat-test	10-250 mg $CaCO_3$/l
18.	Reġim tal-għalf	(Ara l-Anness 4)
19.	Perjodu ta' esponiment	Mill-istadju 8-10 ta' NF sa għaxar ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-grupp tal-kontroll bl-ilma u/jew b'solvent (massimu ta' 17-il ġimgħa)
20.	Punti ta' tmiem bijoloġiċi	Il-mortalità (u dehriet anormali), iż-żmien sal-istadju 62 ta' NF (kampjun tal-larva), il-valutazzjoni tal-istoloġija tat-tirojde (kampjun tal-larva), it-tkabbir (il-piż u t-tul), l-indiċi somatiku tal-fwied (kampjun ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru), il-proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku (kampjun ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru), l-istopatoloġija għall-gonadi, għall-kanali riproduttivi, għall-kilwa u għall-fwied (kampjun taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru) u l-vitelloġenina fil-plażma (kampjun taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru, mhux obbligatorja);
21.	Kriterji ta' validità tat-test	L-ossiġenu dissolt għandu jkun ta' > 40 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja; it-temperatura medja tal-ilma għandha tkun ta' 21 ± 1 °C u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti għandhom ikunu < 1,0 °C; il-pH tas-soluzzjoni tat-test għandha tkun fil-medda ta' bejn 6,5 u 8,5; il-mortalità fil-kontroll għandha tkun ta' ≤ 20 % f'kull replika, u ż-żmien medju għall-istadju 62 ta' NF fil-kontroll għandu jkun ta' ≤ 45 jum; il-piż medju tal-organiżmi tat-test fl-istadju 62 tal-NF u fit-terminazzjoni tal-assaġġ fil-kontrolli u fil-kontrolli b'solvent (jekk użati) għandu jilħaq il-1,0 ± 0,2 u 11,5 ± 3 g, rispettivament; l-evidenza għandha tkun disponibbli biex jintwera li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-valuri medji mkejlin.

▼M8

Appendiċi 4

REĠIM TAL-GĦALF

Ta' min jinnota li għalkemm dan ir-reġim tal-għalf hu rakkomandat, alternattivi huma possibbli dment li l-organiżmi tat-test jikbru u jiżviluppaw b'rata xierqa.

Tagħlif tal-larva

Tħejjija għad-dieta tal-larva

A. 1:1 (v/v) Ikel tal-Bidu tat-Troti: algi/TetraFin® (jew ekwivalenti);

1. Ikel tal-Bidu tat-Troti: ħallat 50 g Ikel tal-Bidu tat-Troti (granuli jew trab fini) u 300 ml ilma filtrat xieraq f'issettjar għoli tal-blender għal 20 sekonda

2. Taħlita ta' algi/TetraFin® (jew ekwivalenti): ħallat 12-il g diski tal-alga spirulina u 500 ml ilma filtrat f'issettjar għoli tal-blender għal 40 sekonda, ħallat 12-il g Tetrafin® (jew ekwivalenti) ma' 500 ml ilma filtrat u mbagħad ħallathom biex tifforma 1 l ta' 12-il g/l alga spirulina u 12-il g/l Tetrafin®(jew ekwivalenti)

3. Għaqqad volumi ndaqs tal-Ikel tal-Bidu tat-Trodi mħallat u tat-taħlita ta' algi/Tetrafin®(jew ekwivalenti)

B. Gamblu tal-ilma mielaħ:

15-il ml bajd tal-gamblu tal-ilma mielaħ jfaqqsu f'litru (1 l) ilma mielaħ (imħejji biż-żieda ta' 20 ml NaCl ma' litru (1) ilma dejonizzat). Wara ossiġenazzjoni għal 24 siegħa f'temperatura ambjentali taħt dawl kostanti, il-gambli tal-ilma mielaħ jinġabru. Għal ftit ħin, il-gambli tal-ilma mielaħ jitħallew jissetjiljaw għal 30 min bit-twaqqif tal-ossiġenazzjoni. Ċisti li jżommu fil-wiċċ tal-kannestru jitbattlu u jintremew, u l-gambli jitferrgħu ġol-filtri xierqa u jinġiebu għal 30 ml bl-ilma filtrat.

Protokoll tat-Tagħlif

It-Tabella 1 tipprovdi referenza rigward it-tip u l-ammont ta' għalf użati matul l-istadji tal-larva tal-esponiment. L-annimali għandhom jintemgħu tliet darbiet kull jum mit-Tnejn sal-Ġimgħa u darba kull jum fi tmiem il-ġimgħa.

Tabella 1

Ir-reġim tal-għalf għal-larva *X. laevis* f'kundizzjonijiet ta' fluss kontinwu

Żmien (*) (Wara l-Fertilizzazzjoni)	Ikel tal-Bidu tat-Troti: algi/TetraFin® (jew ekwivalenti)		Gamblu tal-Ilma Mielaħ	
	Matul il-ġimgħa (tliet darbiet kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)	Matul il-ġimgħa (darbtejn kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)
Jiem 4-14 (fil-Ġimgħat 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (mill-Jum 8 sa 15) 1 ml (mill-Jum 16)	0,5 ml (mill-Jum 8 sa 15) 1 ml (mill-Jum 16)
Ġimgħa 2	0,67 ml	2,4 ml		
Ġimgħa 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Ġimgħa 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Ġimgħa 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Żmien (*) (Wara l-Fertilizzazzjoni)	Ikel tal-Bidu tat-Troti: algi/TetraFin® (jew ekwivalenti)		Gamblu tal-Ilma Mielaħ	
	Matul il-ġimgħa (tliet darbiet kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)	Matul il-ġimgħa (darbtejn kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)
Ġimgħa 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Ġimgħa 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Ġimgħat 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Il-Jum 0 hu definit bħala l-jum li fih issir l-injezzjoni tal-hCG.

Tranżizzjoni mid-dieta tal-larva għal dik ta' annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Hekk kif il-larva tlesti l-metamorfosi, tagħmel tranżizzjoni lejn formulazzjoni ta' dieta għal annimali li jkunu għadhom qed jikbru spjegata hawn taħt. Filwaqt li tkun qed isseħħ din it-tranżizzjoni, id-dieta tal-larva għandha titnaqqas hekk kif jiżdied l-għalf għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru. Dan jista' jinkiseb billi jitnaqqas b'mod proporzjonat l-għalf għal-larva filwaqt li jiżdied b'mod proporzjonat l-għalf għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru hekk kif kull grupp ta' ħames imrieżeb jaqbeż l-istadju 62 ta' NF u joqrob lejn it-tlestija tal-metamorfosi fl-istadju 66 ta' NF.

Tagħlif tal-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Dieta għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Ladarba titlesta l-metamorfosi (stadju 66), ir-reġim tat-tagħlif jinbidel għal ikel taż-żrinġijiet primjm li jinżel fil-qiegħ ta' 3/32 pulzier (Xenopus Express™, FL, l-Istati Uniti), jew ekwivalenti.

Tħejjija tal-gerbub imfarrak għat-tranżizzjoni mil-larva għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Il-gerbub tal-ikel taż-żrinġijiet li jinżel fil-qiegħ jingħadda fil-qosor minn mitħan tal-kafè, minn blender jew minn mehrież u lida biex jitnaqqas id-daqs tal-gerbub b'bejn wieħed u ieħor 1/3. Proċessar twil wisq jirriżulta fi trab u mhuwiex imħeġġeġ.

Protokoll tat-tagħlif

It-Tabella 2 tipprovdi referenza rigward it-tip u l-ammont ta' għalf użati matul l-istadji tal-annimali li jkunu għadhom qed jikbru u tal-ħajja adulta. L-annimali għandhom jintemgħu darba kull jum. Ta' min jinnota li hekk kif l-annimali jimmetamorfizzaw, dawn jibqgħu jirċievu porzjon tal-gambli tal-ilma mielaħ sa > 95 % tal-metamorfosi kompluta tal-annimali.

L-annimali ma għandhomx jingħataw għalf dakinhar tat-terminazzjoni tat-test biex l-għalf ma jfixkilx il-kejlijiet tal-piż.

Tabella 2

Ir-reġim tal-għalf għall-X. laevis li jkunu għadhom qed jikbru f'kundizzjonijiet ta' fluss kontinwu. Ta' min jinnota li l-annimali mhux metamorfizzati, li jinkludu dawk li l-metamorfosi tagħhom tkun ġiet ittardjata mit-trattament kimiku, ma jistgħux jieklu gerbub mhux imfarrak.

Żmien (*) (Ġimgħat wara d-data medjana tal-metamorfosi)	Gerbub imfarrak (mg għal kull żgħir taż-żrinġ)	Gerbub sħiħ (mg għal kull żgħir taż-żrinġ)
Hekk kif l-annimali jlestu l-metamorfosi	25	0
Ġimgħat 0-1	25	28

▼**M8**

Żmien (*) (Ġimgħat wara d-data medjana tal-metamorfosi)	Gerbub imfarrak (mg għal kull żgħir taż-żrinġ)	Gerbub sħiħ (mg għal kull żgħir taż-żrinġ)
Ġimgħat 2-3	0	110
Ġimgħat 4-5	0	165
Ġimgħat 6-9	0	220

(*) L-ewwel jum tal-Ġimgħa 0 hi d-data medjana tal-metamorfosi fl-annimali tal-kontroll.

▼M8

Appendiċi 5

DETERMINAZZJONI TAS-SESS ĠENETIKU (TQASSIM SKONT IS-SESS ĠENETIKU)

Il-metodu ta' tqassim skont is-sess ġenetiku għal *Xenopus laevis* hu bbażat fuq Yoshimoto *et al.*, 2008. Il-proċeduri f'dettall dwar il-ġenotipar jistgħu jinkisbu minn din il-pubblikazzjoni, jekk ikun hemm bżonn. Jistgħu jintużaw metodi alternattivi (eż. qPCR bi throughput għoli) jekk jitqiesu xierqa.

Primers ta' X. laevis

Markatur tad-DM-W

'Il quddiem:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Kontra:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Kontroll Pożittiv

'Il quddiem:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Kontra:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purifikazzjoni tad-DNA

Ippurifika d-DNA mit-tessut tal-muskolu jew tal-ġilda bl-użu ta', eż., Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (kat # 69 506) jew prodott simili skont l-istruzzjonijiet tal-kit. Id-DNA jista' jiġi elwit mill-kolonni dawwara bl-użu ta' anqas bafer biex jintrendew kampjuni aktar konċentrati jekk dawn jitqiesu neċessarji għall-PCR. Kun af li d-DNA hu pjuttost stabbli, u allura għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata li tista' twassal għal karatterizzazzjoni ħażina tal-irġiel bħala nisa, jew viċi versa.

PCR

Protokoll kampjun li juża JumpStart™ *Taq* mingħand Sigma hu spjegat fit-**Tabella 1**.

Tabella 1

Protokoll kampjun li juża JumpStart™ *Taq* mingħand Sigma

Il-Master Mix	1x (µl)	[Finali]
NFW (*)	11	-
10X Bafer	2,0	-
$MgCl_2$ (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (10mM kull wieħed)	0,4	200 µM
Markatur għall-primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Primer kontra tal-markatur (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontroll għall-primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Primer kontra tal-kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unitajiet/µl
Mudell tad-DNA	1,0	~200 pg/µl

(*) Ilma bla nukleaži
Nota: Meta jitħejjew Master Mixes, ħejji ż-żejda biex jikkumpensaw għal kwalunkwe telf li jista' jseħħ matul il-pipettar (eżempju: għandhom jintużaw 25x għal 24 reazzjoni biss).

▼**M8**

Reazzjoni:

Il-Master Mix	19,0 µl
Mudell	1,0 µl
Total	20,0 µl

Profil Termoċiklatur:

Stadju 1.	94 °C	1 min
Stadju 2.	94 °C	30 sek
Stadju 3.	60 °C	30 sek
Stadju 4.	72 °C	1 min
Stadju 5.	Mur għall-istadju 2.	35 ċiklu
Stadju 6.	72 °C	1 min
Stadju 7.	4 °C	żomm

Prodotti tal-PCR jistgħu jintużaw minnufih f'ġel jew jinħażnu f'4 °C.

Elettroforeżi tal-Ġel Agarożi (3 %)(protokoll kampjun)

50X TAE

Tris	24,2 g
Aċidu aċetiku glaċjali	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Żid l-ilma għal 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 Agarożi

3 partijiet agarożi NuSieve™ GTG™

parti (1) elettroendosmożi (EEO) baxxa agarożi Fisher

Metodu

1. Ħejji ġel ta' 3 % billi żżid 1,2 g taħlita ta' agarożi ma' 43 ml 1X TAE. Ħawwad biex tifred tagħqid kbir.

2. Ixħet it-taħlita tal-agarożi fil-microwave sakemm tinħall għalkollox (evita t-togħlija). Ħalliha tibred ftit.

3. Żid 1,0 µL bromur tal-etidju (10 mg/ml). Ħawwad il-flask. Kun af li l-bromur tal-etidju hu mutaġeniku, allura, sa fejn possibbli, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi alternattivi għal dan l-istadju biex jiġu minimizzati r-riskji għas-saħħa tal-ħaddiema ([1]).

4. Ferra' l-ġel f'forma b'moxt. Ħalli jibred għalkollox.

([1]) F'konformità mal-Artikolu 4.1 tad-Direttiva 2004/37/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tad-29 ta' April 2004 dwar il-protezzjoni tal-ħaddiema minn riskji relatati mal-esposizzjoni għal karċinoġeni jew mutaġeni fuq il-post tax-xogħol (Sitt Direttiva individwali fis-sens tal-Artikolu 16(1) tad-Direttiva tal-Kunsill 89/391/KEE) (ĠU L 158, 30.4.2004, p. 50).

▼**M8**

5. Żid il-ġel fuq l-apparat. Iksi l-ġel b'1X TAE.

6. Żid 1 µl 6x kulurant tat-tgħabbija ma' kull 10 µl prodott tal-PCR.

7. Bil-pipetta ixħet kampjuni fil-bwejriet.

8. Ħaddem b'160 volt kostanti għal ~20 minuta.

Stampa tal-ġel tal-agarożi li turi l-mudelli tal-banda li jindikaw individwi maskili u femminili hi pprovduta fil-**Figura 1**.

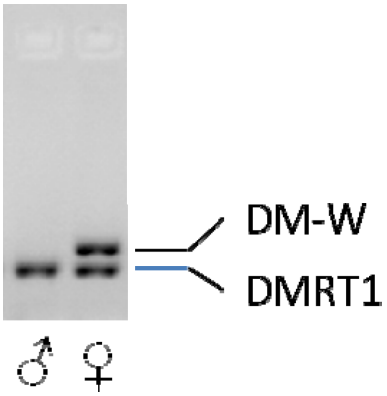


Figura 1 Stampa tal-ġel tal-agarożi li turi l-mudell tal-banda li jindika individwu raġel (♂) (banda waħda ~203 bp: DMRT1) u ta' individwu mara (♀) (żewġ bandi f'~259 bp: DM-W u 203 bp:DMRT1).

DOKUMENTAZZJONI

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

▼**M8**

Appendiċi 6

KEJL TAL-VITELLOĠENINA

Il-kejl tal-vitelloġenina (VTG) isir bl-użu ta' metodu ta' assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiku (ELISA) li oriġinarjament ġie żviluppat għall-VTG tal-karpjun buras (Parks *et al.*, 1999). Bħalissa, ma hemm ebda antikorp kummerċjalment disponibbli għal *X. laevis*. Madankollu, fid-dawl tal-firxa kbira ta' informazzjoni għal din il-proteina u d-disponibbiltà tas-servizzi ta' produzzjoni kummerċjali kosteffikaċi tal-antikorpi, hu raġonevoli li l-laboratorji faċilment ikunu jistgħu jiżviluppaw ELISA biex jagħmlu dan il-kejl (Olmstead *et al.*, 2009). Barra minn hekk, Olmstead *et al.* (2009) jipprovdu wkoll deskrizzjoni tal-assaġġ kif modifikat għall-VTG f'*X. tropicalis*, kif muri hawn taħt. Il-metodu juża antikorp magħmul kontra l-VTG ta' *X. tropicalis*, iżda hu magħruf ukoll li jaħdem għall-VTG ta' *X. laevis*. Ta' min jinnota li jistgħu jintużaw ELISAs mhux kompetittivi wkoll, u li dawn jista' jkollhom limiti ta' detezzjoni inferjuri mill-metodu deskritt hawn taħt.

Materjali u reaġenti

— Serum tal-ewwel antikorp (Ab) preassorbit

— Ħallat parti (1) serum tal-1el Ab tal-VTG anti-*X. tropicalis* ma' 2 partijiet plażma tal-irġiel tal-kontroll u ħalli f'RT għal ~ 75 minuta, itfa' fuq is-silġ għal 30 min, iċċentrifuga > 20K x G għal siegħa (1) f'4 °C, neħħi s-supernatant, l-alikwota, u aħżen f'-20 °C.

— It-2ni Antikorp

— Konjugat tal-IgG-HRP tal-Mogħoż Kontra l-Fniek (eż., Bio-Rad 172-1019)

— Standard tal-VTG

— VTG purifikata ta' *X. laevis* fi 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' Tetrametil-benżidina) (eż., KPL 50-76-00; jew Sigma T0440)

— Serum Normali tal-Mogħoż (NGS)(eż., Chemicon® S26-100ml)

— Pjastri għall-mikrotitraġġ tal-polistiren tal-EIA b'96 bwejra (eż., ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— form tal-ibridazzjoni ta' 37 °C (jew inkubatur tal-arja b'ekwilibrazzjoni veloċi) għall-pjastri, banjumarija għat-tubi

— Tagħmir, sustanzi kimiċi u provvisti komuni oħra tal-laboratorju.

Riċetti

Bafer tal-Kisi (50 mM Bafer tal-Karbonat, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
ilma	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfat, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
ilma	810 ml

▼**M8**

Bafer tal-Ħasil (PBST):

10X PBS	100 ml
ilma	900 ml

Aġġusta l-pH għal 7,3 b'1 M HCl, imbagħad żid 0,5 ml Tween-20

Bafer tal-Assaġġ:

Serum tal-Mogħoż (NGS)	Normali	3,75 ml
Bafer tal-Ħasil		146,25 ml

Ġbir tal-kampjuni

Id-demm jinġabar b'tubu mikroermatokrit eparinizzat u jitqiegħed fuq is-silġ. Wara ċ-ċentrifugazzjoni għal 3 minuti, it-tubu jingħata punteġġ, jinkiser biex jinfetaħ, u l-plażma tinħeles f'0,6 ml tubi mikroċentrifugi li jkun fihom 0,13 unitajiet ta' aprotinina lijofilizzata. (Dawn it-tubi jitħejjew minn qabel billi jiżdied l-ammont xieraq ta' aprotinina, iffriżar u lijofilizzazzjoni fi speed-vac bi sħana baxxa sakemm jinxfu.) Aħżen il-plażma f'-80 °C sakemm tiġi analizzata.

Proċedura għal pjastra waħda

Kisi tal-pjastra

Ħallat 20 µl VTG purifikata ma' 22 ml bafer karbonat (3 µg/ml finali). Żid 200 µl ma' kull bwejra ta' pjastra b'96 bwejra. Għatti l-pjastra b'rita adeżiva tal-issiġillar u ħalliha tinkuba f'37 °C għal sagħtejn (jew 4 °C matul il-lejl).

Imblokkar tal-pjastra

Is-soluzzjoni tal-imlokkar titħejja billi jiżdiedu 2 ml Serum Normali tal-Mogħoż (NGS) ma' 38 ml bafer tal-karbonat. Neħħi s-soluzzjoni tal-kisi u xxotta bit-tħawwid. Żid 350 µl tas-soluzzjoni tal-imblokkar f'kull bwejra.. Għatti b'rita adeżiva tal-issiġillar u inkuba f'37 °C għal sagħtejn (jew f'4 °C matul il-lejl).

Tħejjija tal-istandards

5,8 µl standard tal-VTG purifikata jitħallat ma' 1,5 ml bafer tal-assaġġ f'tubu tat-test tal-ħġieġ li jintrema tal-borosilikat ta' 12 x 75 mm. Dan irendi 12 760 ng/ml. Imbagħad issir dilwizzjoni serjali billi jiżdiedu 750 µl tad-dilwizzjoni preċedenti ma' 750 µl bafer tal-assaġġ biex jinkisbu konċentrazzjonijiet finali ta' 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100, u 50 ng/ml.

Tħejjija tal-Kampjuni

Ibda b'dilwizzjoni ta' 1:300 (eż., għaqqad 1 µl plażma ma' 299 µl bafer tal-assaġġ) jew ta' 1:30 tal-plażma fil-bafer tal-assaġġ. Jekk ikun mistenni ammont kbir ta' VTG, jistgħu jkunu meħtieġa dilwizzjonijiet addizzjonali jew akbar. Ipprova żomm il-B/B_o fi ħdan il-medda tal-istandards. Għal kampjuni mingħajr VTG apprezzabbli, eż., irġiel u nisa tal-kontroll (li lkoll ikunu immaturi), uża d-dilwizzjoni ta' 1:30. Kampjuni dilwiti anqas minn ħekk jistgħu juru effetti matriċi mhux mixtieqa.

Barra minn ħekk, hu rakkomandat li tagħmel kampjun ta' kontroll pożittiv f'kull pjastra. Dan jiġi minn grupp ta' plażma li jkun fih livelli indotti għolja ta' VTG. Il-grupp għall-ewwel jiġi dilwit f'NGS, jiġi diviż f'alikwoti u jinħażen f'-80 C. Għal kull pjastra, alikwota titħalla tinħall, tiġi dilwita aktar f'bafer tal-assaġġ u tintuża b'mod simili għal kampjun tat-test.

▼**M8**

Inkubazzjoni bl-1el antikorp

L-1el Ab jitħejja billi ssir dilwizzjoni ta' 1:2000 serum preassorbit tal-1el Ab f'bafer tal-assaġġ (eż., 8 µl għal 16 ml bafer tal-assaġġ). Għaqqad 3008 µl tas-soluzzjoni tal-1el Ab ma' 300 µl tal-kampjun/tal-istandard f'tubu tal-ħġieġ. It-tubu B_o jitħejja b'mod simili bi 300 µl bafer tal-assaġġ u bi 300 µl antikorp. Barra minn hekk, għandu jitħejja tubu NSB bl-użu ta' 600 µl bafer tal-assaġġ biss, jiġifieri ebda Ab. Għatti t-tubi b'Parafilm u vvortifikahom bil-galbu biex jitħalltu. Inkubahom f'banjumarija ta' 37 °C għal siegħa (1).

Ħasil tal-pjastra

Eżatt qabel ma titlesta l-inkubazzjoni tal-1el Ab, aħsel il-pjastra. Tagħmel dan billi tħawwad il-kontenuti u tixxotta bit-taptip fuq karta assorbenti. Imbagħad imla l-bwejriet bi 350 µl soluzzjoni tal-ħasil, tbattal u tixxotta bit-taptip. Pipetta ripetitur b'diversi kanali jew ħassiel tal-pjastri jkunu siewja hawnhekk. L-istadju tal-ħasil jiġi ripetut darbtejn oħra għal total ta' tliet ħasliet.

Tgħabbija tal-pjastra

Wara li l-pjastra tkun maħsula, neħħi t-tubi mill-banjumarija u vvortifikahom bil-galbu. Żid 200 µl minn kull kampjun, mill-istandard, mill-B_o, u mit-tubu tal-NSB fil-bwejriet duplikati tal-pjastra. Għatti l-pjastra b'rita adeżiva tal-issiġillar u ħalliha tinkuba għal siegħa (1) f'37 °C.

Inkubazzjoni bit-2ni antikorp

Fi tmiem l-inkubazzjoni mill-istadju preċedenti, il-pjastra għandha tinħasel tliet darbiet mill-ġdid, bħalma ntqal hawn fuq. It-2ni Ab dilwit jitħejja bit-taħlit ta' 2,5 µl tat-2ni Ab ma' 50 ml bafer tal-assaġġ. Żid 200 µl tat-2ni Ab dilwit f'kull bwejra, issiġilla bħalma ntqal aktar 'il fuq, u inkuba għal siegħa (1) f'37 °C.

Żieda tas-substrat

Wara li titlesta l-inkubazzjoni bit-2ni Ab, aħsel il-pjastra tliet darbiet kif deskritt aktar 'il fuq. Imbagħad żid 100 µl substrat tat-TMB f'kull bwejra. Ħalli r-reazzjoni tipproċedi għal 10 minuti, idealment protetta minn dawl qawwi. Waqqaf ir-reazzjoni billi żżid 100 µl ta' aċidu fosforiku 1 M. Dan ibiddel il-kulur minn blu għal isfar intens. Kejjel l-assorbanza f'450 nm billi tuża apparat li jkejjel il-pjastri.

Ikkalkola l-B/Bo

Naqqas il-valur medju tal-NSB mill-kejlijiet kollha. Il-B/B_o għal kull kampjun u għall-istandard jiġi kkalkolat bid-diviżjoni tal-valur tal-assorbanza (B) bl-assorbanza medja tal-kampjun tal-B_o.

Ikseb il-kurva standard u ddetermina l-ammonti mhux magħrufa

Iġġenera kurva standard bl-għajnuna ta' xi softwer tal-grafika bil-kompjuter (eż., Slidewrite™ jew Sigma Plot®) li jestrapola l-kwantità mill-B/B_o ta' kampjun fuq il-bażi tal-B/B_o tal-istandards. Tipikament, l-ammont jiġi plottjat fuq skala tal-log u l-kurva jkollha forma sigmojde. Madankollu, jista' jidher lineari meta tintuża medda ristretta ta' standards. Ikkoreġi l-ammonti tal-kampjun għall-fattur ta' dilwizzjoni u rrapporta bħala VTG mg/ml tal-plażma.

Determinazzjoni tal-limiti minimi ta' detezzjoni (MDL)

Spiss, b'mod partikolari f'irġiel normali, mhux se jkun ċar kif tirrapporta r-riżultati minn valuri baxxi. F'dawn il-każijiet, għandhom jintużaw il-Limiti ta' kunfidenza ta' 95 % biex jiġi determinat jekk il-valur għandux jiġi rapportat bħala żero jew xi numru ieħor. Jekk ir-riżultat tal-kampjun ikun fi ħdan l-intervall

▼**M8**

ta’ kunfidenza tal-istandard żero (B_o), ir-riżultat għandu jkun rapportat bħala żero. Il-livell minimu ta’ detezzjoni se jkun l-anqas standard li jkun konsistentement differenti mill-istandard żero; jiġifieri, iż-żewġ intervalli ta’ kunfidenza ma jidħlux f’xulxin. Għal kwalunkwe riżultat tal-kampjun li jkun fi ħdan il-limitu ta’ kunfidenza tal-livell minimu ta’ detezzjoni, jew ogħla, jiġi rapportat il-valur ikkalkolat. Jekk kampjun jaqa’ bejn l-istandard żero u l-intervalli ta’ kunfidenza tal-livell minimu ta’ detezzjoni, nofs il-livell minimu ta’ detezzjoni għandu jiġi rapportat għall-valur ta’ dak il-kampjun.

DOKUMENTAZZJONI

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼**M8**

Appendiċi 7

ANALIŻI STATISTIKA

Il-LAGDA jiġġenera tliet forom ta' *data* li jridu jiġu analizzati statistikament: (1) *Data* kontinwa kwantitattiva, (2) *Data* dwar iż-żmien sal-avveniment għar-rati ta' żvilupp (Żmien sal-istadju 62 ta' NF) u (3) *Data* ordinali fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew tal-istadji tal-iżvilupp mill-evalwazzjonijiet tal-istopatoloġija. Is-siġra deċiżjonali tal-analiżi statistika rakkomandata għal-LAGDA hi murija fil-Figura 1. Barra minn hekk, ċerti annotazzjonijiet li jaf ikunu meħtieġa biex issir analiżi statistika għall-kejlijiet mil-LAGDA huma indikati hawn taħt. Għas-siġra deċiżjonali ta' analiżi, ir-riżultati tal-kejlijiet għall-mortalità, għat-tkabbir (piż u tul) u għall-indiċi somatiku tal-fwied (LSI) għandhom jiġu analizzati skont il-fergħa Punti ta' tmiem oħra.

Data *kontinwa*

Id-*data* għall-punti ta' tmiem kontinwi l-ewwel għandha tiġi verifikata għall-monotoniċità bit-trasformazzjoni tal-klassifikazzjoni tad-*data*, bit-tidħil f'mudell ANOVA u bit-tqabbil tal-kuntrasti lineari u kwadratiċi. Jekk id-*data* tkun monotonika, test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra għandu jsir fuq il-medjani tar-repliki u ma għandha tiġi applikata ebda analiżi sussegwenti. Alternattiva għad-*data* li normalment tiġi distribwita b'varjanzi omoġeni hi t-test ta' tendenza rigressiva ta' Williams. Jekk id-*data* ma tkunx monotonika (kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u lineari ma jkunx sinifikanti), din għandha tiġi analizzata bl-użu ta' mudell ANOVA b'effetti mħallta. Imbagħad id-*data* għandha tiġi vvalutata għan-normalità (idealment bl-użu tat-test ta' Shapiro-Wilk jew ta' Anderson-Darling) u għall-omoġenità tal-varjanza (idealment bl-użu tat-test ta' Levene). Iż-żewġ testijiet isiru fuq ir-residwi mill-mudell ANOVA b'effetti mħallta. Jista' jintuża ġudizzju espert minflok dawn it-testijiet formali għan-normalità u għall-omoġenità tal-varjanza, għalkemm it-testijiet formali huma ppreferuti. Jekk id-*data* jkollha distribuzzjoni normali bil-varjanza omoġena, is-suppożizzjonijiet ta' ANOVA b'effett imħallat ikunu ssodisfati u jiġi determinat trattament sinifikanti mit-test ta' Dunnett. Meta tinstab nonnormalità jew eteroġenità tal-varjanza, is-suppożizzjonijiet tat-test ta' Dunnett ikunu nkisru u titfittex transform stabbilizzanti normalizzati tal-varjanza. Jekk ma jinstab ebda transform, effett ta' trattament sinifikanti jiġi determinat b'test ta' Dunn. Kull meta jkun possibbli, għandu jsir test b'denb wieħed għall-kuntrarju ta' test b'żewġt idnub, iżda jkun hemm bżonn ta' ġudizzju espert biex jiġi determinat liem hu xieraq għal punt ta' tmiem partikolari.

Mortalità

Id-*data* dwar il-mortalità għandha tiġi analizzata għall-perjodu ta' żmien li jkopri t-test sħiħ u għandha tiġi espressa bħala proporzjon li jkun miet fi kwalunkwe tank partikolari. Imrieżeb li ma jlestux il-metamorfożi fil-perjodu ta' żmien partikolari, dawk l-imrieżeb li jkunu fil-koorta tas-subkampjun tal-larva, dawk iż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru li jinqatlu, u kwalunkwe annimal li jmut minħabba errur min-naħa tal-esperimentatur għandhom jiġu trattati bħala *data* ċensurata u ma jiddaħħlux fid-denominatur tal-kalkolu perċentwali. Qabel kwalunkwe analiżi statistika, il-proporzjonijiet tal-mortalità għandhom jiġu trasformati bl-għerq kwadrat arcsin. Alternattiva hi li jintuża t-test ta' tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage, possibilment b'aġġustament ta' Rao-Scott fil-preżenza ta' dispersjoni eċċessiva.

Piż u tul (data dwar it-tkabbir)

L-irġiel u n-nisa ma jkunux sesswalment dimorfiċi matul il-metamorfożi u b'hekk id-*data* dwar it-tkabbir tas-subkampjunar tal-larva għandha tiġi analizzata b'mod indipendenti mill-ġeneru. Madankollu, id-*data* dwar it-tkabbir tal-annimali żgħar li jkunu għadhom qed jikbru għandha tiġi analizzata b'mod separat fuq il-bażi tas-sess ġenetiku. Trasformazzjoni tal-log tista' tkun meħtieġa għal dawn il-punti ta' tmiem peress li n-normalità tal-log tad-*data* dwar id-daqs mhix rari.

▼**M8**

Indiċi somatiku tal-fwied (LSI)

Il-piżijiet tal-fwied għandhom jiġu normalizzati bħala proporzjonijiet tal-piżijiet tal-ġisem sħiħ (jiġifieri LSI) u jiġu analizzati b'mod separat fuq il-bażi tas-sess ġenetiku.

Żmien għall-istadju 62 ta' NF

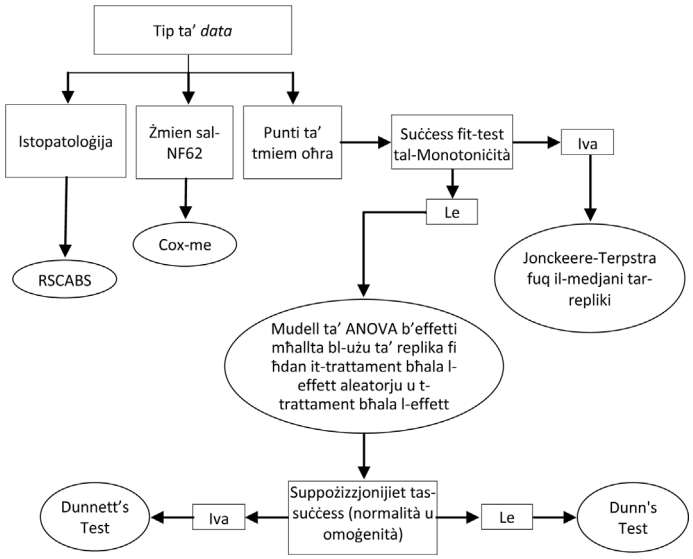
Id-*data* dwar iż-żmien għall-metamorfosi għandha tiġi trattata bħala *data* dwar iż-żmien sa avveniment, bi kwalunkwe mortalità jew individwu li ma jilħaqx l-istadju 62 ta' NF f'70 jum li jiġu trattati bħala *data* right-censored (jiġifieri l-valur veru jkun akbar minn 70 jum iżda l-istudju jintemm qabel ma l-annimal ikun laħaq l-istadju 62 ta' NF f'70 jum). Iż-żmien medja sat-tlestija tal-istadju 62 ta' NF tal-metamorfosi fil-kontrolli tal-ilma ta' dilwizzjoni għandu jintuża biex tiġi determinata d-data ta' terminazzjoni tat-test. Iż-żmien medjan sat-tlestija tal-metamorfosi jista' jiġi determinat bi stimaturi tal-limitu tal-prodott ta' Kaplan-Meier. Dan il-punt ta' tmiem għandu jiġi analizzat bl-użu ta' mudell tal-periklu proporzjonali ta' Cox b'effetti mħallta li jqis l-istruttura tar-repliki tal-istudju.

Id-*data* dwar l-istopatoloġija (punteġġi tas-severità u stadji tal-iżvilupp)

Id-*data* dwar l-istopatoloġija tkun fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew ta' stadji tal-iżvilupp. Test imsejjaħ RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) juża test ta' tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage aġġustat skont Rao-Scott f'kull livell ta' severità f'rispons tal-istopatoloġija (Green *et al.*, 2014). L-aġġustament ta' Rao-Scott jinkorpora d-disinn sperimentali tar-reċipjent tar-replika fit-test. Il-proċedura by Slices tinkorpora l-aspettattiva bijoloġika li s-severità tal-effett għandha tendenza li tiżdied hekk kif jiżdiedu d-dożi jew il-konċentrazzjonijiet, filwaqt li jinżammu l-punteġġi tas-suġġetti individwali u tinstab is-severità ta' kwalunkwe effett misjub. Il-proċedura RSCABS ma tiddeterminax biss liema trattamenti jkunu statistikament differenti mill-kontrolli (jiġifieri jkollhom patoloġija aktar severa mill-kontrolli), iżda tiddetermina wkoll f'liema punteġġ tas-severità sseħħ id-differenza u b'hekk tipprovdi kuntest ferm meħtieġ għall-analiżi. Fil-każ tal-għażla tal-istadji tal-iżvilupp tal-gonadi u tal-kanali riproduttivi, għandha tiġi applikata manipolazzjoni addizzjonali għad-*data* peress li suppożizzjoni tal-RSCABS hi li s-severità tal-effett tiżdied mad-doża. L-effett osservat jista' jdewwem jew iħaffef l-iżvilupp. Għaldaqstant, id-*data* dwar l-għażla tal-istadji tal-iżvilupp għandha tiġi analizzata kif rapportata biex tiġi individwata aċċelerazzjoni fl-iżvilupp u mbagħad tiġi invertita manwalment qabel ma ssir it-tieni analiżi biex jiġi individwat dewmien fl-iżvilupp.

Figura 1

Siġra deċiżjonali tal-analiżi statistika għad-*data* tal-LAGDA.



▼**M8**

DOKUMENTAZZJONI

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

▼**M8**

Appendiċi 8

KUNSIDERAZZJONIJIET GĦAT-TRAĊĊAR U GĦALL-MINIMIZZAZZJONI TAL-OKKORRENZA TA SKOLJOŻI

Skoljoži idjopatika, li normalment tidher bħala denb mgħawweġ f'imrieżeb tal-*Xenopus laevis*, tista tikkomplika l-osservazzjonijiet morfoloġiċi u tal-imġiba fil-popolazzjonijiet tat-test. Għandhom jitwettqu sforzi biex tiġi minimizzata jew eliminata l-inċidenza ta' skoljoži, kemm fl-istokk kif ukoll fil-kundizzjonijiet tat-test. Fit-test definittiv, hu rakkomandat li l-prevalenza ta' skoljoži moderata u severa tkun anqas minn 10 % biex titjieb il-kunfdenza li t-test ikun jista jindividwa effetti fuq l-iżvilupp relatati mat-trattament f'larva tal-anfibji li mill-bqija jkunu f'saħħithom.

Osservazzjonijiet ta' kuljum matul it-test definittiv għandhom jirreġistraw kemm l-inċidenza (għadd tal-individwi) kif ukoll is-severità tal-iskoljoži, meta tkun preżenti. In-natura tal-anormalità għandha tiġi deskritta fir-rigward tal-post (*eż.*, quddiem jew wara l-bokka) u tad-direzzjoni tal-kurvatura (*eż.* latreali jew dorsali għal ventrali). Is-severità tista tiġi gradata kif ġej:

(NR) Mhux rimarkabbli: ebda kurvatura preżenti

(1) Minima: kurvatura laterali ħafifa wara l-bokka; tidher biss waqt il-mistrieħ

(2) Moderata: kurvatura laterali wara l-bokka; viżibbli l-ħin kollu iżda ma tinibixxix il-moviment

(3) Severa:: kurvatura laterali quddiem il-bokka; JEW kwalunkwe kurvatura li tinibixxi l-moviment; JEW kwalunkwe kurvatura dorsali għal ventrali

Il-Bord Xjentifiku Konsultattiv tal- US EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) irrieżamina *data* sommarju għall-iskoljoži fi ħmistax-il Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Anfibji b'*X. laevis* (stadju 51 sa 60+ ta' NF) u pprovda rakkomandazzjonijiet ġenerali għat-tnaqqis tal-prevalenza ta' din l-anormalità fil-popolazzjonijiet tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet huma rilevanti għal-LAGDA anki jekk dan it-test jinkludi perjodu ta' żmien tal-iżvilupp itwal.

Prestazzjoni Storika tar-Riproduzzjoni

Ġeneralment, adulti f'saħħithom ta' kwalità għolja għandhom jintużaw bħala pari tat-tgħammir; l-eliminazzjoni ta' pari tat-tgħammir li jipproduċu wlied bl-iskoljoži tista' timminimizza l-okkorrenza tagħha maż-żmien. Speċifikament, il-minimizzazzjoni tal-użu ta' stokk tat-tnissil maqbud fis-selvaġġ tista' tkun ta' benefiċċju. Il-perjodu ta' esponiment tal-LAGDA jibda b'embrijuni tal-istadju 8 sa 10 ta' NF, u mhuwiex fattibbli li jiġi determinat sa mill-bidu tat-test jekk l-individwi partikolari hux se jesibixxu skoljoži. B'hekk, minbarra t-traċċar tal-inċidenza ta' skoljoži f'annimali ttestjati, għandha tiġi dokumentata l-prestazzjoni storika tal-klaċċ (inkluża l-prevalenza tal-iskoljoži fi kwalunkwe larva li titħalla tiżviluppa). Jista' jkun siewi li tkompli tiġi ssorveljata l-parti ta' kull klaċċ li ma tintużax fi studju partikolari u li dawn l-osservazzjonijiet jiġu rapportati (FIFRA SAP 2013).

Kwalità tal-Ilma

Importanti li tiġi żgurata kwalità adegwata tal-ilma, kemm fl-istokk tal-laboratorju kif ukoll matul it-test. Minbarra l-kriterji tal-kwalità tal-ilma evalwati bħala rutina għal testijiet tat-tossiċità akkwatika, jista' jkun utli li jsiru monitoraġġ u korrezzjoni għal kwalunkwe insuffiċjenza ta' nutrijenti (*eż.*, insuffiċjenza ta' vitamina Ċ, ta' kalċju, ta' fosfru) jew livelli eċċessivi ta' selenju u ta' ram, li huma rapportati li jikkawżaw skoljoži sa gradi varji f'*Rana* sp. u fi *Xenopus* sp. imrobbija fil-laboratorju (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; kif rapportat fil-FIFRA SAP 2013). L-użu ta' reġimen xieraq tad-dieta (ara l-Appendiċi 4), u t-tindif regolari tat-tank, ser itejbu b'mod ġenerali l-kwalità tal-ilma u s-saħħa tal-eżemplari tat-test.

▼**M8**

DIETA

Rakkomandazzjonijiet speċifiċi għal reġimen djetetiku, li nstab li rnexxew fil-LAGDA, huma spjegati fl-Appendiċi 4. Hu rakkomandat li s-sorsi tat-tagħlif jiġu skrinjati għal tossini bijoloġiċi, għal erbiċidi, u għal pestiċidi oħra li huma maħrufa li jikkawżaw skoljożi f'*X. laevis* jew f'annimali akkwatiċi oħra (Schlenk u Jenkins 2013). Pereżempju, l-esponiment għal ċerti inibituri tal-kolinesteraži ġie assoċjat mal-iskoljożi fil-ħut (Schultz *et al.* 1985) u żrinġijiet (Bacchetta *et al.* 2008).

DOKUMENTAZZJONI

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, u G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, u R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, u J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, u D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, u P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., u Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. Minuti tal-US EPA FIFRA SAP Nru 2013-03. 21-23 ta' Mejju 2013. Washington, DC.